

**Untersuchungen über den Diphosphoinositid-
komplex des Rinderhirns und anderer
Säugetierorgane**

Helmut Karl Wiedemann

1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548306_0025

Untersuchungen über den Diphosphoinositidkomplex des Rinder-
hirns und anderer Säugetierorgane

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt
von
Helmut Karl Wiedemann
aus
Kaufbeuren

Januar 1963



Berichterstatter: Privat-Dozent Dr. H. W a g n e r
Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.1963

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

E I N L E I T U N G u n d Z I E L S E T Z U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Der Diphosphoinositidkomplex des Rinderhirns	2
I. Struktur und Nomenklatur	2
II. Gewinnung des Diphosphoinositidkomplexes aus Rinder- hirn	5
1. Bisherige Arbeiten zur Isolierung des Diphospho- inositidkomplexes	5
2. Eigene Arbeiten zur Darstellung des Diphosphoino- sitidkomplexes	8
a) Extraktion	8
b) Vorfraktionierung	9
c) Abtrennung des Diphosphoinositidkomplexes durch hochstufige Craig-Verteilung	10
d) Isolierung des Diphosphoinositidkomplexes über eine Formaldehydzellulosesäule	13
e) Reinisolierung des Diphosphoinositidkomplexes durch Craig-Verteilung über 15 Stufen	13
III. Zur Analytik des isolierten Diphosphoinositidkomple- xes	21
1. Versuche zur Auftrennung des intakten Diphospho- inositidkomplexes	21
a) Papierchromatographie	21
b) Dünnschichtchromatographie des Diphosphoinosi- tidkomplexes	28
c) Papierelektrophorese des Diphosphoinositidkom- plexes	29
d) Versuche zur weiteren Auftrennung des Diphos- phoinositidkomplexes durch Craig-Verteilung	30
2. Chemische Untersuchung des Diphosphoinositidkom- plexes	32
a) Saure und alkalische Hydrolyse	32
b) Enzymatische Hydrolyse	38
c) Quantitative Bestimmung der Elemente und Spalt- produkte des Diphosphoinositidkomplexes und Diskussion	39

IV. Quantitative Bestimmung der einzelnen Phosphatide von Ätherextrakt, Folch 1-Fraktion und Diphosphoinositidkomplex nach papierchromatographier Auftrennung	47
B. Über das Vorkommen und den Nachweis des Diphosphoinositidkomplexes in den Säugetierorganen Herzmuskel, Lunge, Leber, Milz und Niere	50
C. In vivo-Einbau von ^{32}P in den Diphosphoinositidkomplex der Rattenorgane Gehirn, Niere, Lunge, Herzmuskel, Milz und Leber	54
I. Bisherige Arbeiten über den Stoffwechsel der Inositolphosphatide	54
II. Eigene Untersuchungen	57
1. Ergebnisse des ^{32}P -Einbaus	62
2. Diskussion	68
EXPERIMENTELLER TEIL	73
A. Gewinnung des Diphosphoinositidkomplexes des Rinderhirns	73
I. Acetonextraktion	73
II. Ätherextraktion	73
III. Ausfällung der Folch 1-Fraktion	75
IV. Isolierung des Diphosphoinositidkomplexes	76
1. Hochstufige Verteilung ohne vorherige Entfernung wasserlöslicher Bestandteile	76
2. Hochstufige Craig-Verteilung nach Entfernung der wasserlöslichen Bestandteile	77
3. Chromatographische Auftrennung des Gemisches aus Diphosphoinositidkomplex und Phosphatidylserin an einer Formaldehydzellulosesäule	78
4. Präparative Verteilung in Schütteltrichtern	79
5. Reinigung des Diphosphoinositidkomplexes durch Zellulosesäulenchromatographie	81
B. Analytik des Diphosphoinositidkomplexes	82
I. Papierchromatographie	82
II. Versuche zur weiteren Auftrennung des Diphosphoinositidkomplexes durch Craig-Verteilung	85
III. Saure und alkalische Hydrolysen	86
IV. Enzymatische Hydrolyse	91

V. Quantitative Bestimmung der Elemente und Spaltprodukte	92
VI. Bestimmung einzelner Phosphatide	100
C. Der Diphosphoinositidkomplex in Lunge, Herzmuskel, Leber, Niere und Milz	103
I. Nachweis durch Chromatographie und Autoradiographie .	103
II. Versuche zur Isolierung des Lungendiphosphoinositidkomplexes	104
D. Einbaustudien von ^{32}P in die Rattenorgane Gehirn, Herzmuskel, Lunge, Leber, Milz und Niere	106
I. Markierung der Phosphatide mit ^{32}P in vivo	106
II. Extraktion der Phosphatide	106
III. Papierchromatographische Auftrennung und Lokalisierung der Phosphatide durch Autoradiographie	107
IV. Messung der relativen Aktivität und des Phosphorgehaltes	108
V. Berechnung der spezifischen Aktivität	111
VI. Meßdaten	111

E I N L E I T U N G u n d Z I E L S E T Z U N G

Durch Einbauversuche mit markiertem Phosphat in die Phosphatide des Rattenhirns konnte in den letzten Jahren von HOKIN und HOKIN¹⁾, BROCKERHOFF und BALLOU²⁾ sowie von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER³⁾ festgestellt werden, daß die inosithal-
t i g e n Phosphatide einen auffallend hohen Phosphatumsatz im Vergleich zu den anderen Phosphatiden besitzen. Dabei zeigte die Diphosphoinositidfraktion eine höhere Einbaurrate als das Monophosphoinositid. Darüber hinaus scheinen die Inositphosphatide nach HOKIN und HOKIN⁴⁾ auch maßgeblich am Kationen-Transport durch die Zellmembran beteiligt zu sein.

Angeregt durch diese Untersuchungen befaßten sich mehrere Arbeiten intensiv mit der Auftrennung des Inositphosphatidkomplexes und der Aufklärung der einzelnen Komponenten. Während in unserem Arbeitskreis aus dem Gemisch schon vor Jahren ein Monophosphoinositid isoliert werden konnte⁵⁾, waren die von verschiedenen Seiten unternommenen Versuche, auch die anderen Bestandteile zu isolieren, mangels geeigneter Trennmethoden erfolglos geblieben.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich daher erneut auf die Isolierung und Analytik des Diphosphoinositidkomplexes des Rinderhirns. Sie beschäftigt sich weiterhin mit dem Vorkommen und dem Stoffwechsel der Inositphosphatide auch in anderen Säugetierorganen und versucht zu klären, ob auch dort eine physiologische Sonderstellung dieser Phosphatidklasse gegeben ist.

1) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, Biochim.biophysica Acta 18, 102 (1955)

2) H.BROCKERHOFF u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 237, 49 (1962)

3) H.WAGNER, A.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, Biochem.Z. 335, 312 (1961)

4) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, Nature 184, 1068 (1959)

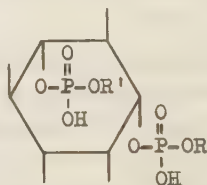
5) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 330, 591 (1958)

ALLGEMEINER TEIL

A. Der Diphosphoinositidkomplex des Rinderhirns

I. Struktur und Nomenklatur

1949 isolierte FOLCH⁶⁾⁷⁾ aus dem Rinderhirn ein neues inosithaltiges Phosphatid, das bei der salzsauren Hydrolyse als einziges inosithaltiges Spaltprodukt m-Inositdiphosphat lieferte. Auf Grund dieser und anderer Ergebnisse schlug er für diese Verbindung nachfolgende Struktur vor:



R und R': Diglyzeride

HAWTHORNE⁸⁾ diskutierte später für das "Diphosphoinositid", wie er diese Verbindung nannte, eine ringförmige Struktur, mußte diese allerdings auf Grund neuerer Untersuchungen⁹⁾ aufgeben.

Im Jahre 1958 entdeckten HÖRHAMMER, WAGNER und HÖLZL¹⁰⁾ im Rinderhirn neben dem "Diphosphoinositid" erstmals ein Monophosphoinositid. Dieses war bisher nur im Herzmuskel¹¹⁾ und in der Leber¹²⁾ gefunden worden, nicht aber im Gehirn. Ebenfalls von HÖRHAMMER, WAGNER und HÖLZL konnte gezeigt werden, daß das bisher als einheitliche Substanz betrachtete "Diphosphoinositid" des Rinderhirns papierchromatographisch in zwei

-
- 6) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 497 (1949)
 - 7) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 505 (1949)
 - 8) J.N.HAWTHORNE, Biochimbiophysica Acta 18, 389 (1955)
 - 9) J.N.HAWTHORNE, J.Lipid Research 1, 255 (1960)
 - 10) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 330, 591 (1958)
 - 11) M.FAURE u. M.J.MORELEC-COULON, Bull.soc.chim.biol. 40, 1067 (1958)
 - 12) J.M.Mc.KIBBIN, Federation Proc. 13, 262 (1954)

bis drei Komponenten auftrennbar ist. WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹³⁾ untersuchten anschließend das "Diphosphoinositid" des Rattenhirns und stellten eindeutig fest, daß es aus zwei Komponenten besteht. Bei diesem Stand der Kenntnisse über Zusammensetzung und Struktur des "Diphosphoinositids" setzten die vorliegenden Untersuchungen ein.

Zwischenzeitlich berichteten DITTMER und DAWSON¹⁴⁾ über die Anwesenheit von zwei verschiedenen Triphosphoinositiden im Rinderhirn. GRADO und BALLOU¹⁵⁾ gewannen durch alkalische Hydrolyse des nach der klassischen Vorschrift von FOLCH¹⁶⁾ hergestellten "Diphosphoinositids" ein Inositphosphatgemisch, das aus Inositolmonophosphat, Inositolbisphosphat und Inositoltrisphosphat bestand. Alle Komponenten waren optisch aktiv und stammten nach Annahme der Autoren von einem Triphosphoinositid. In einer neueren Arbeit beschrieben BROCKERHOFF und BALLOU¹⁷⁾ die Desacylierung des intakten "Diphosphoinositids" und die Auftrennung der desacylierten Produkte durch Ionenaustauschchromatographie. Sie fanden drei verschiedene Glycerininositphosphate und identifizierten diese als 1-Glycerylphosphorylinosit, 1-Glycerylphosphorylinosit-4-Phosphat und 1-Glycerylphosphorylinosit-4,5-Diphosphat.

13) H.WAGNER, A.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, Biochem.Z. 335, 312 (1961)

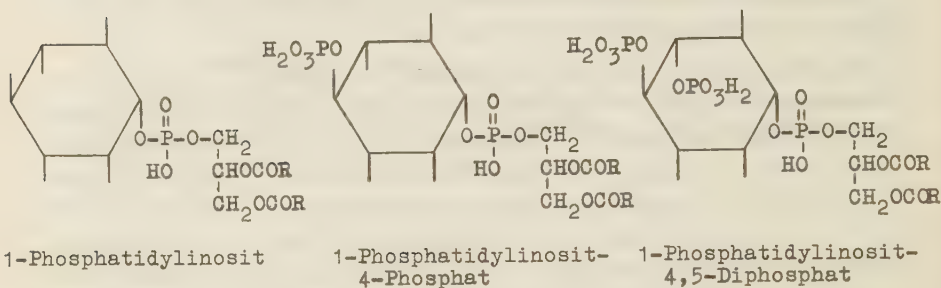
14) J.C.DITTMER u. R.M.C.DAWSON, Biochim.biophysica Acta 40, 379 (1960)

15) C.GRADO u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 236, 54 (1961)

16) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 497 (1949)

17) H.BROCKERHOFF u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 236, 1907 (1961)

Auf Grund dieser Ergebnisse soll die Inositphosphatidfraktion des Rinderhirns nunmehr aus folgenden Substanzen bestehen:



Auf die kürzlich von DAWSON und Mitarbeiter¹⁸⁾¹⁹⁾ veröffentlichten Ergebnisse zu dem gleichen Thema wird an anderer Stelle dieser Arbeit eingegangen.

In seinem Vorkommen ist das "Diphosphoinositid" ausschließlich auf das Tierreich beschränkt. Lange Zeit konnte es nur im Gehirn gefunden werden²⁰⁾. Kürzlich wurde nun in unserem Arbeitskreis nachgewiesen, daß diese Substanz nicht nur im Gehirn, sondern auch in anderen Säugetierorganen enthalten ist²¹⁾. Im Gegensatz zum "Diphosphoinositid" kommt jedoch das Monophosphoinositid im Tier- und Pflanzenreich vor. FAURE und MORELEC-COULON²²⁾ isolierten es aus dem Herzmuskel und KLENK und SAKAI²³⁾ aus dem Sojalecithin. Systematische Untersuchungen von DAWSON²⁴⁾ ergaben, daß Niere, Leber, Skelettmuskulatur, Lunge und Herzmuskel Monophosphoinositid enthalten. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß kürzlich KLENK und HENDRICKS²⁵⁾ im menschlichen Gehirn ein neues Inositphosphatid fanden, das neben Hexosen auch Hexosamin enthalten soll.

-
- 18) J.C.DITTMER u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 81, 535 (1961)
 - 19) R.M.C.DAWSON u. J.C.DITTMER, Biochem.J. 81, 540 (1961)
 - 20) D.J.HANAHAN, Lipide Chemistry, John Wiley and Sons, New York-London, p. 113 (1960)
 - 21) L.HÖRHAMMER, J.HÖLZL u. H.WAGNER, Naturwissenschaften 48, 103 (1961)
 - 22) M.FAURE u. M.J.MORELEC-COULON, Compt.rend. 238, 411 (1954)
 - 23) E.KLENK u. R.SAKAI, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 258, 33 (1939)
 - 24) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 75, 45 (1960)
 - 25) E.KLENK u. U.W.HENDRICKS, Biochim.biophysica Acta 50, 602 (1961)

Da das "Diphosphoinositid" keine einheitliche Substanz darstellt, bezeichnen wir es im Folgenden als Diphosphoinositidkomplex (Abkürzung: DPI-K).

II. Gewinnung des Diphosphoinositidkomplexes aus Rinderhirn

Als Ausgangsprodukte für die Gewinnung des DPI-K dienen die Gehirne frisch geschlachteter Tiere. Der Isolierungsgang gliedert sich in drei Phasen:

1. Gewinnung der Extrakte
2. Vorfraktionierung
3. Die Reindarstellung des DPI-K

1. Bisherige Arbeiten zur Isolierung des Diphosphoinositidkomplexes

Die einzigen Verfahren zur Isolierung des DPI-K wurden von FOLCH²⁶⁾²⁷⁾ und HÖLZL²⁸⁾ entwickelt.

Für die E x t r a k t i o n des frischen Gehirngewebes verwenden beide Autoren selektiv wirkende Lösungsmittel. Nach FOLCH werden die zerkleinerten Gehirne mit Aceton und Alkohol vorextrahiert. Dadurch wird das Extraktionsgut entwässert und von Cholesterin, Neutralfetten, freien Fettsäuren und Lecithin befreit. Die anschließende Hauptextraktion erfolgt mit Petroläther. Sie erfaßt neben anderen Phosphatiden hauptsächlich die Inositphosphatide und liefert das Ausgangsmaterial zur weiteren Isolierung des "Diphosphoinositids" nach FOLCH. HÖLZL dagegen führt die Vorextraktion ausschließlich mit Aceton und die Hauptextraktion mit Äther durch. Nach Untersuchungen von LISSAU²⁹⁾ ist dieses zweite Verfahren der Methode von FOLCH überlegen, da Alkohol bereits einen Teil der inosithaltigen Phosphatide löst und Äther gegenüber Petroläther eine um 50%

-
- 26) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 146, 35 (1942)
27) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 497 (1949)
28) J.HÖLZL, Dissertation München (1959)
29) A.LISSAU, Dissertation München (1960)

höhere Ausbeute an Extraktivstoffen ergibt.

Wie sich aber zeigte, liefern beide Verfahren Extrakte mit einem relativ hohen Gehalt an Begleitstoffen hydrophilen Charakters. In ihnen wurden vor allem reichlich freie Aminosäuren, Zucker, braune Zersetzungsprodukte, Lysoverbindungen und anorganisches Phosphat gefunden.

Diese sind in ihrer Löslichkeit dem DPI-K sehr ähnlich. Daher reichern sie sich im weiteren Verlauf der Isolierung in hohem Maße an und erschweren die Abtrennung. Während der Entwässerung mit Aceton erwärmt sich das Gewebe auf 35 - 40°C. Inwieweit dadurch eine Veränderung des DPI-K eintritt, ist im einzelnen nicht bekannt. Doch muß damit gerechnet werden, daß in dieser Aufarbeitungsphase die von SLOANE-STANLEY³⁰⁾, RODNIGHT³¹⁾ sowie THOMPSON und DAWSON³²⁾ in Gehirnsuspensionen gefundenen, hochaktiven und den DPI-K bevorzugt angreifenden Enzymsysteme zur Wirkung kommen, zumal bekannt ist, daß Phospholipasen in organischen Lösungsmitteln aktiv bleiben, bzw. aktiviert werden.

Die weitere Fraktionierung der Extrakte dient der Anreicherung des DPI-K. Nach FOLCH wird das aus dem Petrolätherextrakt gewonnene Rohkephalin durch einige Umfällungen gereinigt, anschließend in Chloroform gelöst und durch Zugabe einer bestimmten Menge Äthanol die sogenannte Folch 1-Fraktion ausgefällt. Dieser Niederschlag stellt das Ausgangsprodukt zur weiteren Isolierung des DPI-K dar. Ähnlich wird die Vorfraktionierung nach HÖLZL durchgeführt. Der Ätherextrakt wird hierbei in Analogie zu einer Arbeit von DEBUCH³³⁾ mehrmals umgefällt. Die Abtrennung des Lecithins erfolgt hier durch eine Äther-Äthanol-Fällung, wobei das alkohollösliche Lecithin in Lösung bleibt. Die weitere Vorfraktionierung geschieht hier ebenfalls über die Folch 1-Fraktion.

30) G.H.SLOANE-STANLEY, Biochem.J. 53, 613 (1953)

31) R.RODNIGHT, Biochem.J. 63, 223 (1955)

32) W.THOMPSON u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 83, 5P (1962)

33) H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)

Beide Verfahren führen durch die wiederholten Umfällungen des Kephhalins zu erheblichen Substanzverlusten und zu einer Braunfärbung sämtlicher Phosphatide.

Nicht zu verbessern ist dagegen die Vorschrift zur Darstellung der Folch 1-Fraktion. Sie erwies sich bestens geeignet zur Vorfraktionierung des DPI-K, da durch eine einzige Fällung eine ca. 10fache Anreicherung dieser Substanz möglich ist.

Die Herstellung des DPI-K nach FOLCH basiert im wesentlichen auf einer 12maligen Umfällung nach der Chloroform-Alkohol-Methode. Dazu wird die vorfraktionierte Substanz in Chloroform gelöst und das Konzentrat mit einer bestimmten Menge Methanol versetzt. Das ausgefällte "Rohdiphosphoinositid" wird 4 Tage dialysiert, um den Hauptanteil des anorganischen Phosphats zu entfernen. HÖLZL dagegen chromatographiert die vorfraktionierte Substanz an einer Zellosesäule nach SMITH³⁴⁾ und entfernt dadurch den größten Teil des anorganischen Phosphats. Zur weiteren Anreicherung des DPI-K führt er eine hochstufige Craig-Verteilung mit dem Lösungsmittelsystem Ligroin/Methanol (97%) (3:2) durch.

Wie sich beim Nacharbeiten herausstellte, ist das Verfahren von FOLCH zur Abtrennung eines reinen DPI-K nicht geeignet. Es werden dadurch weder Phosphatidylserin noch Monophosphoinositid völlig abgetrennt. Diese Beobachtung findet in Arbeiten von GRADO und BALLOU³⁵⁾, DAWSON und DITTMER³⁶⁾ sowie von KEMP und Mitarbeitern³⁷⁾ ihre Bestätigung. GRADO und BALLOU betrachten das Monophosphoinositid als einen zugehörigen Bestandteil des DPI-K. DAWSON und DITTMER fanden nach 10 Methanolfällungen noch 32% Phosphatidylserin in der Fraktion vor. Das Phosphatidylserin kann auch durch 20 - 30 Fällungen nicht entfernt werden.

34) R.H.SMITH, Biochem.J. 57, 130 (1954)

35) C.GRADO u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 236, 54 (1961)

36) R.M.C.DAWSON u. J.C.DITTMER, Biochem.J. 81, 540 (1961)

37) P.KEMP, J.N.HAWTHORNE, H.G.SAMMONS u. R.E.BELLIS, in P.Desnuelle (Editor), The Enzymes of Lipid Metabolism, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, p. 43 (1961)

Das Verfahren nach HÖLZL liefert zwar einen wesentlich reineren DPI-K, doch enthält er immer noch etwas Phosphatidylserin und anorganisches Phosphat. Hinzu kommt, daß auf Grund des angewandten, wasserhaltigen Verteilungssystems äußerst stabile Emulsionen entstehen, wodurch die Graig-Verteilung nur schwer reproduzierbar ist.

Demnach führen die bisherigen Darstellungsverfahren nicht zu einem reinen DPI-K. Im Folgenden wurde daher ein verbesserter Isolierungsgang ausgearbeitet.

2. Eigene Arbeiten zur Darstellung des Diphosphoinositidkomplexes

a) Extraktion

Unserer Extraktionsmethode lag ein Mikroverfahren nach LISSAU³⁸⁾ zugrunde. Dieses wurde zur Gewinnung inositphosphatidreicher Gesamtextrakte des Rattenhirns entwickelt. Wir übertrugen das Mikroverfahren in den präparativen Maßstab und modifizierten es in einigen Punkten. Die wichtigste Veränderung gegenüber den bisherigen Extraktionsverfahren von FOLCH und HÖLZL bestand in der Trocknung des Gewebes durch Lyophilisierung^{*)}. Während LISSAU das lyophilisierte Gewebe zur weiteren Extraktion homogenisierte, wurde das Extraktionsgut im Rahmen dieser Arbeit nur grob zerkleinert. Dies geschah aus zwei Gründen:

1. verhindern feinste Suspensionen den Lösungsmitteldurchlauf im Perkulator oder Soxhletapparat, sofern es sich um die Extraktion präparativer Substanzmengen handelt,
2. ergaben Untersuchungen von BROCKERHOFF und BALLOU³⁹⁾, daß die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus des DPI-K in Homogenisaten eher gegeben ist, als in grob zerkleinertem Gewebe.

Die Vorextraktion des zerkleinerten Gewebes mit Aceton wurde in Abänderung des Verfahrens von LISSAU durch wiederhol-

38) A. LISSAU, Dissertation München (1960)

39) H. BROCKERHOFF u. C. E. BALLOU, J. biol. Chemistry **237**, 49 (1962)

*) Wir danken Herrn Dr. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, für die Bereitstellung der Gefriertrockenanlage.

te Mazeration vorgenommen, da dieses Verfahren bei der Menge und Beschaffenheit des vorliegenden Extraktionsgutes wesentlich rascher durchführbar war, als die Perkolation. In Übereinstimmung mit der Mikromethode erfolgte die Herstellung des Ätherextraktes nach dem Soxhletprinzip. Der so gewonnene Ätherextrakt wurde, wie jeder Schritt des Isolierungsganges, mit Hilfe der Papierchromatographie überprüft. Wir fanden Inositphosphatide, Phosphatidylserin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylcholin. Daneben waren anorganisches Phosphat, Aminosäuren und geringe Mengen von Gangliosiden und Cerebrosiden vorhanden.

Das Extraktionsverfahren ergab folgende Ausbeuten:
Aus 3830 g lyophilisiertem Gehirn (= 15.000 g Frischgewicht) resultierten

930 g Acetonextrakt und 435 g Ätherextrakt

Wir erhielten auf diesem Wege heller gefärbte, von Lysoformen absolut freie und wesentlich haltbarere Phosphatidextrakte, als nach den bisherigen Extraktionsmethoden. Ihr Gehalt an wasserlöslichen Begleitsubstanzen beschränkte sich auf anorganisches Phosphat und geringe Mengen Aminosäuren.

b) Vorfraktionierung

In Abweichung von den bisherigen Verfahren beschränkte sich die Vorfraktionierung auf eine einmalige Ausfällung der Folch 1-Fraktion. Der dabei erhaltene, ölige, farblos-gelbliche Niederschlag enthält nach papierchromatographischer Prüfung angereichert die Inositphosphatide, ferner Phosphatidylserin, Phosphatidyläthanolamin, Lecithin nur noch in Spuren, Ganglioside, Aminosäuren in geringer Menge und anorganisches Phosphat. In Lösung bleibt der Hauptanteil des Lecithins.

Nach den bisherigen Methoden zur Vorfraktionierung des DPI-K waren mehrere Umfällungen zur Reinigung des "Rohkephalins" erforderlich. Für die Reinisolierung des DPI-K

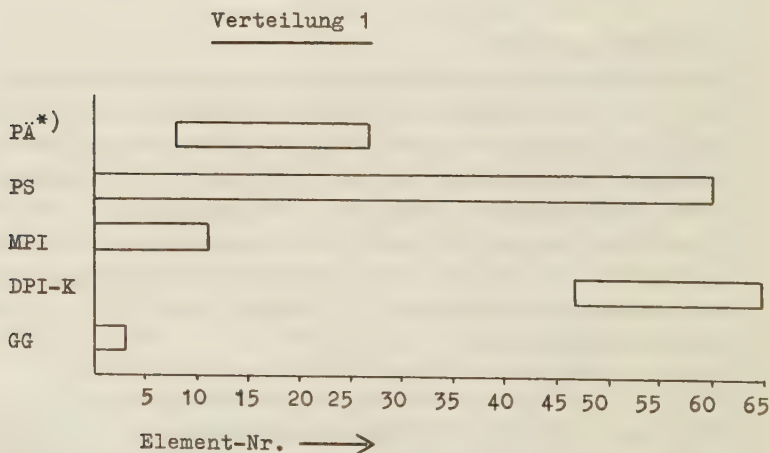
nach dem vorliegenden Verfahren sind diese Umfällungen bedeutungslos und wurden daher übergangen.

Die so erhaltene Folch 1-Fraktion diente als Ausgangsmaterial für die Anreicherung des DPI-K.

c) Abtrennung des Diphosphoinositidkomplexes durch hochstufige Craig-Verteilung

Bei den bisherigen Arbeiten zur Isolierung des DPI-K war der Reinigungseffekt durch wiederholte fraktionierte Fällung geringer, als bei der hochstufigen multiplikativen Verteilung. Deshalb versuchten wir zunächst mit Hilfe des zweiten Verfahrens die Reinisolierung des DPI-K.

Es stand hierfür die vollautomatische Verteilungsapparatur nach v.METZSCH⁴⁰⁾ zur Verfügung. Da das von HÖLZL eingesetzte Lösungsmittelsystem Ligroin (90-100°)/Methanol(97%) (3:2) stabile Emulsionen verursachte, verwendeten wir ein wasserärmeres System, bestehend aus Spezialbenzin(120-140°)/Methanol (364:235). Damit verteilten wir die Folch 1-Fraktion über 65 Stufen. Ober- und Unterphasen wurden gemeinsam chromatographiert. Dabei ließ sich folgende, hier schematisch dargestellte Substanzverteilung ermitteln:



40) F.A.v.METZSCH, Chemie-Ing.-Techn. 25, 66 (1953)

*) siehe Seite 11

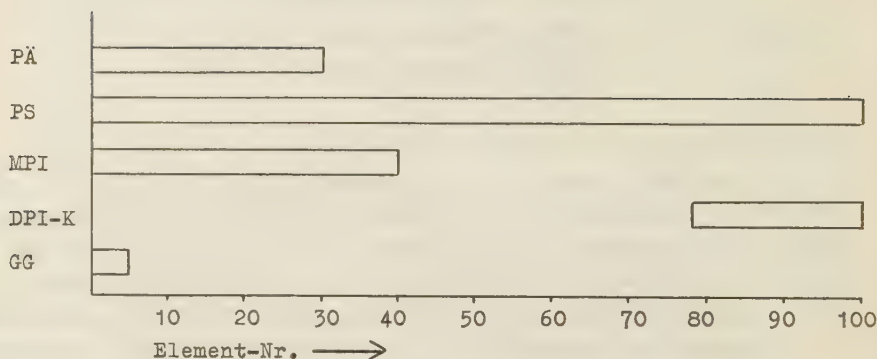
- *) Abkürzungen: PÄ = Phosphatidyläthanolamin
PS = Phosphatidylserin
MPI = Monophosphoinositid
DPI-K = Diphosphoinositid-Komplex
GG = Ganglioside

Der DPI-K befand sich in den Verteilungsstufen 47 - 65 und war von Element 53 - 65 stark angereichert. Seine Löslichkeit in Ober- und Unterphasen war so gering, daß er sich nach mehrstündigem Stehen als gallertige, gelbe Zwischenschicht zwischen den beiden Phasen anreicherte und anschließend abzentrifugiert wurde. Die Verunreinigungen bestanden aus ca. 40% anorganischem Phosphat und Spuren von Phosphatidylserin und Aminosäuren. Nach Einengen zur Trockne war der DPI-K nur noch in Spuren in der Oberphase von Butanol/Eisessig/Wasser löslich und in allen anderen in Frage kommenden Lösungsmitteln nahezu unlöslich. Dadurch war auch eine weitere Abtrennung der Verunreinigungen nicht möglich. Vermutlich liegt der unlösliche DPI-K in einer polymeren Struktur vor, wie sie bereits von FOLCH und LEBARON⁴¹⁾ für "Diphosphoinositid" diskutiert wurde.

Bei einem zweiten Isolierungsversuch reinigten wir zunächst die Folch 1-Fraktion von anorganischem Phosphat und Aminosäuren. Dies gelang über eine Zelloulosesäule nach SMITH⁴²⁾. Die vorgereinigte Folch 1-Fraktion wurde mit dem gleichen Lösungsmittelsystem wie bei Verteilung 1 über 100 Stufen verteilt. Das folgende Schema zeigt die Verteilung der Phosphatide:

41) J.FOLCH u. F.N.LEBARON, Can.J.Biochem.Physiol. 34, 304 (1956)
42) R.H.SMITH, Biochem.J. 57, 130 (1954)

Verteilung 2



Die Verteilungsstufen 78 - 100 enthielten den DPI-K zusammen mit Phosphatidylserin. Alle anderen Substanzen waren restlos entfernt. Das Gemisch aus DPI-K und Phosphatidylserin löste sich gut in wassergesättigtem Chloroform. Weitere Versuche, das Phosphatidylserin durch eine erhöhte Anzahl von Verteilungsschritten zu eliminieren, führten nicht zum Erfolg.

Diese zweite Verteilung zeigt, daß die vorherige Entfernung des anorganischen Phosphats die Abtrennung des DPI-K von anderen Phosphatiden erschwert. In Übereinstimmung damit stehen Beobachtungen von FOLCH⁴³⁾, der zur Gewinnung der Substanz aus dialysiertem Material 30 Chloroform-Methanol-fällungen benötigte. Dagegen waren nur 12 Fällungen erforderlich, wenn von nicht dialysiertem Material ausgegangen wurde.

Da Säulenverfahren zur Isolierung von Phosphatiden vielfach Verwendung finden, versuchten wir, das Gemisch aus DPI-K und Phosphatidylserin aus der zweiten multiplikativen Verteilung (Stufe 94 - 100) weiter aufzutrennen. Nachdem die Chromatographie auf Formaldehydpapier nach HÖRHAMMER, WAGNER und RICHTER⁴⁴⁾ eine gute Auftrennung der Phosphatide, besonders der Inositphosphatide, ergibt, wurde dieses Verfahren in den Säulenmaßstab übertragen.

43) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 497 (1949)

44) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

d) Isolierung des Diphosphoinositidkomplexes über eine Formaldehydzellulosesäule

Dazu diente Zellulosepulver, das mit Paraformaldehyd hydrophobiert war. Die Lösung des Gemisches DPI-K/Phosphatidylserin aus der Verteilung 2, Stufe 94 - 100, wurde auf die Säule aufgetragen und mit der Oberphase des Systems Butanol/Wasser chromatographiert. Das Eluat sammelten wir in 30 Anteilen zu je 3.5 ml. Die papierchromatographische Überprüfung des Ergebnisses zeigte folgende Verteilung der Phosphatide:

Fraktion 7 - 8	Phosphatidylserin
Fraktion 9 - 14	Phosphatidylserin und DPI-K
Fraktion 15 - 26	DPI-K

Obwohl das Verfahren in kleinem Maßstab gut durchführbar war und reine Substanz ergab, erwies es sich für die präparative Darstellung des DPI-K als zu umständlich und zu verlustreich. Deshalb arbeiteten wir ein neues Trennverfahren für den DPI-K wiederum auf der Grundlage einer multiplikativen Verteilung aus.

e) Reinisolierung des Diphosphoinositidkomplexes durch Craig-Verteilung über 15 Stufen

Voraussetzung war ein Lösungsmittelsystem mit größerer Trennfähigkeit.

Bisher fanden folgende in Tabelle 1 aufgeführten Lösungsmittelsysteme zur Auftrennung inosithaltiger Phosphatide Verwendung. Zur Abtrennung des DPI-K aus der Folch 1-Fraktion erwiesen sich diese als nicht ausreichend.

T a b e l l e 1

Verteilungssysteme für Inositphosphatide

Lipoidquelle	Lösungsmittelsystem	Literatur
Schellfisch	Leichtpetroleum/Äthanol (85%) (1:1)	45)
Sojabohnen	Hexan/Methanol (95%) (1:1)	46)
Linsen	Hexan/Äthanol (90%) (1:1)	47)
Pferdeleber	Benzin/Petroläther/Methanol/ Aceton/Wasser(280:120:240:80:80)	48)
Gehirn	Ligroin (90°-100°)/Methanol (97%) (3:2)	49)

Modifiziert man aber ein Verteilungssystem nach COLE und Mitarbeitern⁵⁰⁾ durch den Zusatz von Pyridin, so kann der DPI-K aus der Folch 1-Fraktion rein isoliert werden. Das Lösungsmittelgemisch setzte sich zusammen aus Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser/Pyridin/Petroläther (356:264:35:71:86).

Da die Verteilungselemente der vollautomatischen Apparatur durch das geringe Phasenvolumen die Menge der in einem Arbeitsgang einsetzbaren Substanz auf maximal 5 g begrenzen, führten wir diesmal die Verteilung in 15 Schütteltrichtern durch. Das Volumen dieser Gefäße kann beliebig groß gewählt werden, so daß in einem Arbeitsgang größere Lipidmengen verteilt werden können.

-
- 45) J.A.LOVERN u. J.OLLEY, J.biol.Chemistry 55, 686 (1953)
46) C.R.SCHOLFIELD, J.Amer.Oil Chemist's Soc. 25, 368 (1948)
47) T.A.McGUIRE u. F.R.EARLE, J.Amer.Oil Chemist's Soc. 28, 328 (1951)
48) J.M.McKIBBIN, J.biol.Chemistry 206, 613 (1954)
49) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)
50) P.G.COLE, G.H.LATHE u. C.R.J.RUTHVEN, Biochem.J. 54, 449 (1953)

Im Gegensatz zu der vollautomatischen Apparatur und der Handapparatur nach HECKER, bei denen die Oberphasen die mobile und die Unterphasen die stationäre Phase bilden, war bei unserer Methode die untere Phase die mobile.

Die Folch 1-Fraktion wurde in Ober- und Unterphase des ersten Verteilungselementes (= Schütteltrichter 1) gelöst und über 15 Stufen verteilt. Die Ober- und Unterphasen wurden den Schütteltrichtern getrennt entnommen, zur Trockne eingeengt und ausgewogen. Anschließend führten wir die papierchromatographische Analyse der 15 Verteilungsstufen durch.

Wie die Abb. 1a zeigt, enthielten die Unterphasen 14 und 15 ausschließlich die beiden Komponenten des DPI-K. Daneben war noch anorganisches Phosphat vorhanden. In Unterphase 13 fanden wir den DPI-K neben Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Phosphatidyläthanolamin. Aus Abb. 1b ist ersichtlich, daß das Diphosphoinositid 1 in den Oberphasen 11 - 15 zusammen mit Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und teilweise auch mit Phosphatidyläthanolamin enthalten war. In den Oberphasen 1 - 3 fanden wir neben Monophosphoinositid und Phosphatidylserin zwei bis drei Ganglioside. In allen übrigen Ober- und Unterphasen befanden sich Gemische, die sich teils aus Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Phosphatidyläthanolamin, teils nur aus den beiden ersten Phosphatiden zusammensetzten.

Abb. 1a

Papierchromatogramm der Schütteltrichterverteilung
(Unterphasen)

Front

PÄ

PS

MPI

DPI 1

DPI 2



Fließmittel:

Butanol/Eisessig/
Wasser (4:1:5),
aufsteigend (24 cm)
auf Formaldehydpapier

Anfärbemittel:

Nilblaulösung

Abkürzungen: s. Abb. 1b

Start

1 3 5 7 9 11 13 14-15

Nr. der Verteilungsstufe →

. Abb. 1b

Papierchromatogramm der Schütteltrichterverteilung
(Oberphasen)

Front

PÄ

PS

MPI

DPI 1

GG



Anfertigung des Chromatogramms wie bei
Abb. 1a

Abkürzungen:

PÄ = Phosphatidyl-
äthanolamin

PS = Phosphatidylserin

MPI = Monophosphoino-
sitid

DPI₁ = Diphosphoinositid¹⁾

DPI₂ = Diphosphoinosi-
tid 2 (Triphos-
phoinositid)

GG = Ganglioside

Start

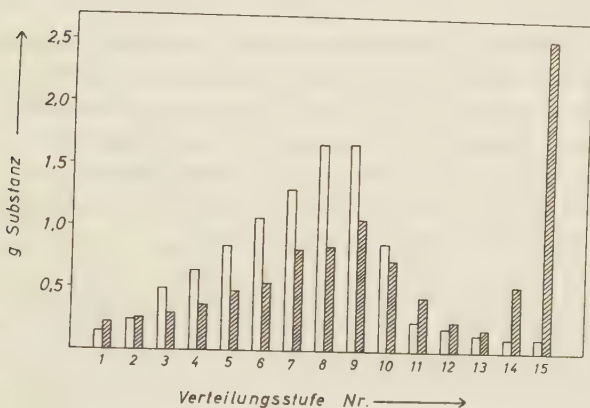
1 3 5 7 9 11 13 15

Nr. der Verteilungsstufe →

Die quantitative Verteilung der in den 15 Ober- und Unterphasen gefundenen Phosphatidgemische bezieht sich auf eine Ausgangssubstanz von 20 g Folch 1-Fraktion. Sie ist aus Abb. 2 ersichtlich.

Abb. 2

Graphische Darstellung der in den Ober- und Unterphasen enthaltenen Substanzmengen



□ = Oberphase

▨ = Unterphase

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, weisen die Unterphasen von Element 1 - 9 steigende und von Element 10 - 13 kontinuierlich sinkende Phosphatidmengen auf. Eine außerordentlich starke Substanzzunahme zeigen die Unterphasen 14 und 15, wobei Nr. 15 ca. 1/8 der verteilten Gesamtsubstanz enthält. Es handelt sich um den DPI-K, der hier zusammen mit anorganischem Phosphat stark angereichert ist. Auch bei den Oberphasen beobachtet man von Element 1 - 9 ein kontinuierliches Ansteigen der Werte, während eine Abnahme der Substanzmengen von Element 10 - 15 festzustellen ist.

Auffallend ist, daß der DPI-K in dem neuen Verteilungssystem eine völlig andere Löslichkeit als das Monophosphoinositid zeigt. Dies läßt die Vermutung zu, daß die Komponenten des DPI-K strukturell ähnlich gebaut sein müssen.

Abtrennung des anorganischen Phosphats

Der isolierte DPI-K enthielt als Verunreinigung noch anorganisches Phosphat. Um dieses zu entfernen, wurde die Substanz nach SMITH⁵¹⁾ an Zellulose chromatographiert. Fließmittel war die Unterphase des Gemisches Chloroform/Äthanol/Wasser. Während die wasserlöslichen Substanzen in den oberen Zelluloseschichten adsorbiert werden, lassen sich die Phosphatide mit dem gleichen Lösungsmittel gut eluieren. Sobald die Phosphatide den untersten Säulenabschnitt erreicht hatten, wurde wassergesättigtes Chloroform als Fließmittel verwendet. Die Untersuchung des Eluates erfolgte papierchromatographisch.

Danach lieferte der neue Isolierungsgang einen weitgehend reinen DPI-K, der nur noch 0.92% anorganisches Phosphat enthielt. Die überaus empfindliche, papierchromatographische Prüfung läßt erkennen, daß erstmals Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und alle anderen Lipide quantitativ vom DPI-K abgetrennt worden waren. Ebenso gelang es, sämtliche ninhydrinpositiven Komponenten restlos zu entfernen.

Das neu ausgearbeitete Isolierungsverfahren ist äußerst schonend, nimmt nur relativ kurze Zeit in Anspruch und eignet sich damit zur Gewinnung größerer Mengen reiner Substanz.

51) R.H.SMITH, Biochem. J. 57, 130 (1954)

Eigenschaften des Diphosphoinositidkomplexes

Die isolierte Substanz fiel als feinkörniges, weißgelbliches Pulver an. Sie war in Wasser unlöslich, in wassergesättigtem Chloroform schwer löslich und löste sich am besten in der Unterphase des Gemisches Chloroform/Äthanol/Wasser (80:20:2.5). Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine amorphe Struktur. Das Erhitzen des DPI-K in einer Schmelzpunktsapparatur verursachte eine beginnende Braunfärbung bei 168°. Bei 267° verkohlte die Substanz unter Schwarzfärbung und Zusammensintern ohne Schmelzen.

Der DPI-K wurde papierchromatographisch mit einem nach DITTMER und DAWSON⁵²⁾ isolierten Triphosphoinositid verglichen. Dabei ergab sich, daß Triphosphoinositid noch etwas Monophosphoinositid und Phosphatidylserin, daneben aber auch noch die zweite Komponente des DPI-K enthielt. Auf Grund der angewandten Methodik und des Fehlens quantitativer Ausbeuteangaben erscheint es fraglich, ob das von den Autoren angegebene Verfahren überhaupt eine Isolierung des Triphosphoinositids im präparativen Maßstab ermöglicht. Zudem können die Ionenaustauscher, welche hierbei zur Entfernung des anorganischen Phosphats Verwendung finden, hydrolysierend auf die Phosphatide einwirken.

Die folgende Tabelle 2 enthält zusammenfassend die Ausbeuten an DPI-K aus Extraktion, Vorfraktionierung und Reinisolierung nach dem neuen Gewinnungsverfahren.

52) J.C.DITTMER u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 81, 535 (1961)

T a b e l l e 2

Ausbeuten aus 15 kg Rinderhirn

Substanz	Ausbeute in g	Ausbeute in %
Ätherextrakt	435	2.9
Folch 1-Fraktion	60	0.4
DPI-K vor Säulenreinigung	9.27	0.062
DPI-K nach Säulenreinigung	3.70	0.025

Die in Tabelle 2 angegebenen Werte beziehen sich auf die Ausgangssubstanz von 15 kg Frischhirn. Während Ätherextrakt und DPI-K nach Gefriertrocknung ausgewogen wurden, ermittelten wir bei der Folch 1-Fraktion das Gewicht des feuchten Niederschlages, da hier eine vollständige Trocknung die Wiederauflösung in dem verwendeten Verteilungssystem erschwert hätte. Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, wird der DPI-K mit fortschreitender Fraktionierung angereichert. Durch die Säulenbehandlung des DPI-K tritt eine Gewichtsabnahme von ca. 60% ein. Diese dürfte zu ca. 40% durch abgetrenntes anorganisches Phosphat und zu ca. 20% durch Substanzverlust verursacht werden. Die Ausbeute an reinem DPI-K betrug 0.025% bezogen auf 15 kg Rinderhirn und 0.85% bezogen auf 435 g Ätherextrakt.

III. Zur Analytik des isolierten Diphosphoinositidkomplexes

Für die Analyse eines Phosphatidgemisches, wie es im DPI-K vorliegt, stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung. Man kann die intakten Komponenten entweder durch Chromatographie oder multiplikative Verteilung trennen und anschließend analysieren oder das Phosphatidgemisch hydrolysieren und dann die dabei entstandenen Spaltprodukte untersuchen. Da beim zweiten Verfahren verschiedene Phosphatide die gleichen Spaltprodukte wie z.B. Inosit, Phosphat, Glyzerin und Fettsäuren liefern können, versuchten wir eine Auftrennung intakter Phosphatide zu erreichen.

1. Versuche zur Auftrennung des intakten Diphosphoinositidkomplexes

a) Papierchromatographie

Nur mit Hilfe von i m p r ä g n i e r t e n Filterpapieren ist eine gute papierchromatographische Auftrennung von Gemischen intakter Phosphatide möglich. LEA und Mitarbeiter⁵³⁾, sowie MARINETTI und Mitarbeiter⁵⁴⁾ verwenden zur Papierchromatographie von Phosphatiden Silikagelpapier und das Fließmittel Methanol/Chloroform (1:4) bzw. Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (40:30:7). Eigene Versuche zeigten in Übereinstimmung mit HAWTHORNE⁵⁵⁾, daß dieses Papier zur Chromatographie des DPI-K ungeeignet ist, da die Substanz am Startpunkt festgehalten wird. Auch das von AGRANOFF und Mitarbeitern⁵⁶⁾ für Monophosphoinositid erprobte silikagelimpregnierte Glasfaserpapier (Fließmittel: Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (45:5:6) bewährt sich nicht.

Deshalb führten wir die papierchromatographische Analyse des DPI-K ausschließlich mit Formaldehydpapier nach HÖRHAMMER, WAGNER und RICHTER⁵⁷⁾ durch. Als Laufmittel diente die Oberphase des Gemisches Butanol/Eisessig/Wasser.

-
- 53) C.H.LEA, D.N.RHODES u. R.D.STOLL, Biochem.J. 60, 353 (1955)
54) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, Biochim.biophysica Acta 21, 168 (1956)
55) J.N.HAWTHORNE, J.Lipid Research 1, 255 (1960)
56) B.W.AGRANOFF, R.M.BRADLEY u. O.R.BRADY, J.biol.Chemistry 233, 1077 (1958)
57) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

HÖRHAMMER, WAGNER u. HÖLZL⁵⁸⁾ hatten damit die beste Auftrennung des DPI-K erzielt. Auch MARINETTI⁵⁹⁾ hebt in seiner zusammenfassenden Arbeit über die Chromatographie der Phosphatide die besonders gute Anwendbarkeit des Formaldehydpapiers für die Auftrennung der Inositphosphatide und des Phosphatidylserins hervor.

Wir chromatographierten auf- und absteigend und machten die Phosphatide durch die üblichen Lipidfärbereagenzien (siehe Tabelle 3) sichtbar. Anstelle des Fließpapiers Nr. 2043 bG1 der Fa. Schleicher u. Schüll verwendeten wir das Ederolpapier Nr. 208 der Fa. Binzer, weil es sich durch größere Zerreißfestigkeit auszeichnet.

Der isolierte DPI-K trennt sich hierbei in zwei Substanzen auf. Die R_f -Werte aus mehreren Chromatogrammen betragen für die zwei Diphosphoinositide 0.37 bzw. 0.3. Die Abb. 3 zeigt nebeneinander das Chromatogramm des reinen DPI-K (a) und einer Gehirnposphatidfraktion (b), die noch zusätzlich Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Monophosphoinositid u n d den DPI-K enthält.

58) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)

59) G.V.MARINETTI, J.Lipid Research 3, 1 (1962)

Abb. 3

Diphosphoinositidkomplex und Folch 1-Fraktion des Rinderhirns

Front

PÄ

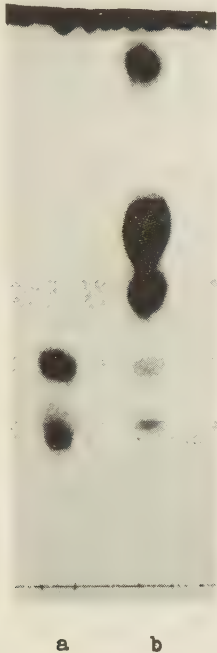
PS

MPI

DPI 1

DPI 2

Start



Fließmittel:

Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5),
aufsteigend (23 cm) auf
Formaldehydpapier

Anfärbemittel: Nilblaulösung

a = Diphosphoinositidkomplex

b = Folch 1-Fraktion

PÄ = Phosphatidyläthanolamin

PS = Phosphatidylserin

MPI = Monophosphoinositid

DPI 1 = Diphosphoinositid 1

DPI 2 = Diphosphoinositid 2
(Triphosphoinositid)

Tabelle 3 enthält die zur Charakterisierung der Diphosphoinositidflecken angewandten Phosphatidfärbemethoden. Hierbei verhielten sich die beiden Diphosphoinositide völlig gleich, d.h. sie lieferten mit den angewandten Reagenzien dieselben Ergebnisse. Sie unterschieden sich somit nur durch den R_f -Wert.

T a b e l l e 3

Papierchromatographische Färbemethoden für Lipide

Nr.	Reagenz	Reagierende Substanz	Farbe	Reaktion mit dem DPI-K	Literatur
1	Nilblau	Alle Phosphatide, bevorzugt saure	blau	+	60)
2	Osmiumtetroxyd	Ungesättigte Doppelbindungen der Fettsäuren	schwarz	+	60)
3	Fuchsin-schweflige Säure	Plasmalogene	fuchsinrot	+	60)
4)	Rhodamin	Phosphatide Lysoformen	rot Entfärbung	+	61)
5	Malachitgrün	Phosphatide Lysoformen	grün Entfärbung	-	62)
6)	Ammoniummolybdat-Perchlorsäure	Organisch gebundenes Phosphat	blau	+	63)
7	Ninhydrin	NH ₂ enthaltende Phosphatide, Aminosäuren	violett, rot, gelb	-	64)
8	Phosphormolybdänsäure	Cholin enthaltende Phosphatide	blau	-	65)

Anschließend erprobten wir noch weitere Laufmittel, um für spätere quantitative Bestimmungen bzw. für die Säulenchromatographie optimale Trennbedingungen herauszufinden.

Tabelle 4 zeigt die R_F -Werte des DPI-K und einer Bezugssubstanz bei der Chromatographie an Formaldehydpapier in verschiedenen Fließmittelsystemen.

- 60) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
 61) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Amer.chem.Soc. 77, 6668 (1955)
 62) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
 63) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature (London) 164, 1107 (1949)
 64) F.CRÄMER, Papierchromatographie, Weinheim/Bergstraße (1954)
 65) L.DOUSTE-BLAZY, J.POLONOVSKI u. P.VALDIGUIE, C.R. hebdom. Seances Acad.Sci., Paris 235, 1643 (1952); ref. C.A. 47, 5981 (1953)

T a b e l l e 4

R_F -Werte der Diphosphoinositide und des Phosphatidylserins mit verschiedenen Fließmitteln

Fließmittel	R_F -Wert der Diphosphoinositide DPI 1	R_F -Wert der Diphosphoinositide DPI 2	R_F -Wert von Phosphatidylserin	Laufzeit in Std. aufsteigend über 27 cm
1	0.37	0.3	0.69	12
2	0.35	0.29	0.67	14
3	0.18-0.54*)	0.18-0.54*)	0.85	10
4	0-0.1*)	0-0.1*)	0-0.48	6
5	0.095	0.095	0.29	10
6	0	0	0	6
7	0-0.16*)	0-0.16*)	0.53	5
8	0.68	0.68	0.41	5
9	0	0	0.85	5
10	0.08	0.08	0.52	8
11	0	0	0	5
12	0	0	0	10
13	0-0.31*)	0-0.31*)	0-0.31*)	4

Erklärungen: 1 = Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)
 2 = Isobutanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)
 3 = Butanol/Eisessig/Wasser (3:1.5:1.5)
 4 = Heptan/Butanol/Methanol/Wasser (12:8:3.8:16)
 5 = n-Butanol (wassergesättigt)
 6 = Butanol/Aceton (7:3)
 7 = Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (40:25:5)
 8 = Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser (45:5:6)
 9 = Methanol/Chloroform/Wasser (4:1:0.15)
 10 = Äthanol/Butanol/Wasser (10:40:10)
 11 = Heptan/Äthanol 85% (1:1)
 12 = Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (10:2:3)
 13 = Petroläther/Äthanol 85% (1:1)

Abkürzungen: DPI 1 = Diphosphoinositid 1
 DPI 2 = Diphosphoinositid 2
 (Triphosphoinositid)

*) Diese Fließmittel führten zu einer Schwanzbildung.

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, erfolgte eine Auftrennung des DPI-K in zwei Substanzen nur durch die Fließmittel 1 und 2. Alle anderen lieferten gleiche R_f -Werte für beide Komponenten oder waren gänzlich unbrauchbar. Das Fließmittel 8 trennt den DPI-K zwar nicht in zwei Bestandteile auf, liefert jedoch einen für die Substanz auffallend hohen R_f -Wert von 0.68.

Ein eigenartiges Verhalten zeigt der DPI-K bei der 2-dimensionalen Papierchromatographie mit den Laufmitteln 1 und 8. Verwendet man das System 1 für die 1. Laufrichtung und System 8 für die 2. Laufrichtung, so wandert die Substanz nicht mehr in die zweite Richtung. Werden die Fließmittel in umgekehrter Reihenfolge angewendet, stimmen die erzielten R_f -Werte mit der Tabelle überein.

Offensichtlich wird der DPI-K durch das Fließmittel Butanol/Eisessig/Wasser so verändert, daß er im System Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser keine Löslichkeit mehr aufweist. Eine 2-dimensionale Auftrennung des DPI-K mit Butanol/Eisessig/Wasser gelingt dagegen sehr gut.

Die Anfärbereaktionen von Tabelle 3 sind für die einzelnen Phosphatide nicht spezifisch. Ein eindeutiger Nachweis für I n o s i t phosphatide ist damit nicht möglich. Deshalb wurde versucht, den DPI-K und das Monophosphoinositid über ihre charakteristische Komponente, das Inosit, unmittelbar auf dem Chromatogramm zu identifizieren.

Für den papierchromatographischen Nachweis des f r e i e n Inosits stehen Verfahren nach CERBULIS⁶⁶⁾, CIFONELLI und SMITH⁶⁷⁾, WOLFROM und MILLER⁶⁸⁾ sowie NAGAI und KIMURA⁶⁹⁾ zur Verfügung. Sie ergeben jedoch mit dem g e b u n d e n e n Inosit der Phosphatide keine Reaktion. Daher behandelten wir

66) J.CERBULIS, Anal.Chem. 27, 1400 (1955)

67) J.A.CIFONELLI u. F.SMITH, Anal.Chem. 26, 1132 (1954)

68) M.L.WOLFROM u. J.B.MILLER, Anal.Chem. 28, 1037 (1956)

69) Y.NAGAI u. Y.KIMURA, Nature (London) 181, 1730 (1958)

die Chromatogramme zunächst mit Säuren, Alkali oder Phosphatase, um das Inosit des Monophosphoinositids nach einer vorausgegangenen kräftigen Alkalihydrolyse in Anlehnung an das Verfahren von NAGAI und KIMURA⁷⁰⁾ direkt auf dem Chromatogramm zu identifizieren. Dazu wurde das betreffende Chromatogramm mit 2n Kalilauge besprüht und an der Luft getrocknet. Die anschließend durchgeführte Farbreaktion beruht auf der Oxydation des Inosits zur Rhodizonsäure über Tetraoxychinon als Zwischenstufe. Das Bariumsalz der Rhodizonsäure tritt als orangefarbener Fleck auf dem Chromatogramm in Erscheinung, während das anschließend hergestellte Calciumrhodizonat rosa bis hellrot gefärbt ist.

Zusammen mit dem Phosphatnachweis nach HANES und ISHERWOOD⁷¹⁾ und auf Grund des R_f -Wertes ermöglicht diese Methode, die auf Glukose und Galaktose oder andere Alkohole nicht anspricht, einen eindeutigen Nachweis des Monophosphoinositids direkt auf dem Chromatogramm. Dagegen scheiterten alle Versuche, den DPI-K auf analoge Weise zu charakterisieren. Vermutlich ist hierfür die schwere Hydrolysierbarkeit dieser Substanz verantwortlich.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, war eine papierchromatographische Auftrennung des DPI-K in seine beiden Komponenten ausschließlich bei Verwendung des Fließmittels Butanol/Eisessig/Wasser möglich. Da oftmals eine einheitliche Substanz durch den Einfluß des papierchromatographischen Verfahrens in verschiedene Komponenten aufgespalten werden kann, versuchten wir die Auftrennung des DPI-K in seine beiden Bestandteile auch mittels Dünnschichtchromatographie und Papierelektrophorese. Dadurch sollte der Beweis für die Existenz beider Diphosphoinositidkomponenten bestätigt werden.

70) Y.NAGAI u. Y.KIMURA, Nature (London) 181, 1730 (1958)

71) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature (London) 164, 1107 (1949)

- b) Dünnschichtchromatographie des Diphosphoinositidkomplexes
WAGNER, HÖRHAMMER und WOLFF⁷²⁾⁷³⁾ gelang mit Hilfe der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie eine gute Auftrennung von Phosphatiden. Der Versuch, diese Methode auch auf den DPI-K zu übertragen, scheiterte daran, daß die Substanz wie an Silikagelpapier sehr stark adsorbiert wurde und mit allen untersuchten Fließmitteln unmittelbar am Startpunkt zurückblieb, während Monophosphoinositid mit den Fließmitteln 1 und 2 brauchbare R_F -Werte lieferte. In der Tabelle 5 sind die untersuchten Fließmittel, die R_F -Werte des DPI-K und einer Bezugssubstanz aufgeführt.

T a b e l l e 5

Verhalten der Inositolphosphatide bei Kieselgel-G-Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Fließmitteln

Fließmittel	R_F -Wert der Diphosphoinositide	R_F -Wert von Monophosphoinositid	Laufzeit in Std. über 15 cm
1	0-0.5*)	0.85	1
2	0-0.17*)	0.4	2 1/2
3	0	0-0.7*)	1 1/2
4	0	0	1
5	0	0-0.1*)	2
6	0	0-0.1*)	1 1/2
7	0-0.18*)	0-0.35*)	2

- Erklärungen: 1 = Chloroform/Methanol/Wasser (3:2:0.5)
2 = Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (40:30:7)
3 = Chloroform (wassergesättigt)/1 n Salzsäure (50:0.2)
4 = Heptan/Methanol (Oberphase)
5 = Pyridin/Wasser (95:5)
6 = Aceton/Methanol/Äthanol/Isopropyläther (60:20:20:10)
7 = Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser/Pyridin/Petroläther (298:220:29:34:72)
*) Diese Fließmittel führten zu einer Schwanzbildung.

72) H. WAGNER, L. HÖRHAMMER u. P. WOLFF, Biochem. Z. 334, 175 (1961)

73) H. WAGNER, Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 62, 1115 (1960)

c) Papierelektrophorese des Diphosphoinositidkomplexes

Das Verfahren wurde auf dem Phosphatidgebiet erstmals von ZIPPER und GLANTZ⁷⁴⁾ erprobt. Nach Angaben dieser Autoren wandert das "Diphosphoinositid" in einer nach Folch isolierten Kephalinfraktion bei der Papierelektrophorese in Richtung der Kathode. In Anlehnung an das von ZIPPER und GLANTZ ausgearbeitete Verfahren untersuchten wir das papierelektrophoretische Verhalten des DPI-K und verwendeten hierfür Substanzen, die nach unserer Methode und nach Folch gewonnen worden waren. Als Bezugssubstanzen dienten Phosphatidylserin und anorganisches Phosphat. Zur Durchführung dieser Versuche stand ein Elphorgerät der Fa. Bender u. Hobein zur Verfügung. Die angelegte Spannung betrug 440 V, die Stromstärke 20 mA. Die gewählten Entwicklungszeiten erstreckten sich über sechs, 10 und 24 Stunden. Es wurden sowohl Pherogramme mit einfachen Elphorstreifen als auch solche mit formaldehydimprägnierten angefertigt. Als Elektrolytssystem diente eine 0.5 normale Lösung von Natriumacetat in dem Gemisch Methanol/Pyridin/Eisessig (8:1:1). Der pH-Wert betrug 4.9.

Der DPI-K zeigte unter diesen Bedingungen eine nur minimale Wanderungsgeschwindigkeit, so daß keine Auftrennung erreicht wurde. Phosphatidylserin wanderte dagegen erwartungsgemäß zur Anode und legte in 10 Stunden eine Strecke von 2 cm zurück. Auf formaldehydimprägniertem Papier wanderte diese Substanz 7 cm. Anorganisches Phosphat bewegte sich auf beiden Papiersorten in 10 Stunden um 4 cm in Richtung Anode.

74) H.ZIPPER u. M.D.GLANTZ, J.biol.Chemistry 230, 621 (1958)

d) Versuche zur weiteren Auftrennung des Diphosphoinositidkomplexes durch Craig-Verteilung

Wie die ersten Versuche zur Isolierung des DPI-K gezeigt hatten, bietet die multiplikative Verteilung eine gute Möglichkeit, um Gemische intakter Phosphatide aufzutrennen.

Zunächst wurde der DPI-K in einer Handapparatur nach HECKER⁷⁵⁾ über 28 Stufen verteilt. Das 2-Phasensystem bestand aus einem Methanol/Benzin-Gemisch. Die Verteilungserfolgten wir papierchromatographisch. Die Unterphasen 1 -12 enthielten das Diphosphoinositid 1 (R_f 0.37) in Spuren, während in den Unterphasen 13 - 28 beide Diphosphoinositide (R_f 0.37; R_f 0.3) vorhanden waren. Auch die Oberphasen 1 - 28 enthielten beide Diphosphoinositide, wobei sich die Hauptmenge der eingesetzten Substanz in den Elementen 25 - 28 angereichert hatte. Wir erhöhten nun die Stufenzahl auf 60 Elemente. Aber auch damit war nur eine geringe Abtrennung von Diphosphoinositid 1 zu erzielen.

Versuche, die Trennergebnisse durch Anwendung anderer Systeme, wie z.B. des Gemisches Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser/Pyridin/Petroläther zu verbessern, verliefen ebenfalls negativ. Die Ausbeute an reinem Diphosphoinositid 1 war auch hier gering (Abb. 4). Ein gleiches Resultat erbrachte die Verteilung mit einem System Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser.

Bemerkenswert ist das konträre Verhalten der Diphosphoinositide in dem Benzin/Methanol-System einerseits und den tetrachlorkohlenstoffhaltigen Systemen andererseits. Während sich Diphosphoinositid 1 im ersten Falle in den vordersten Unterphasen sammelte, reicherte es sich in den anderen Systemen in den Oberphasen der höher bezifferten Verteilungselemente an. In jedem Fall bleibt die Hauptmenge des DPI-K in dem hydrophilen Lösungsmittelanteil. Diese Beobachtung stimmt mit dem chromatographischen Verhalten der Substanz in dem Fließmittelsystem Butanol/Eisessig/Wasser überein. Auch hier ist der DPI-K das hydrophilste aller Phosphatide.

75) E.HECKER, Chemie-Ing.-Techn. 25, 505 (1953)

Abb. 4

Abtrennung des Diphosphoinositids 1 durch multiplikative Verteilung

Front



Fließmittel:

Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5),
aufsteigend auf Formaldehyd-
papier

Anfärbemittel: Nilblaulösung

U = Unterphase

O = Oberphase

DPI 1 = Diphosphoinositid 1

DPI 2 = Diphosphoinositid 2
(Triphosphoinositid)

DPI 1

DPI 2

Start

U

O

1 - 2 10-28

Die Menge des bei den verschiedenen Verteilungen abgetrennten Diphosphoinositids 1 war so gering, daß sie nur für den papierchromatographischen Test ausreichend war.

2. Chemische Untersuchung des Diphosphoinositidkomplexes

a) Saure und alkalische Hydrolyse

Die chemische Untersuchung der Phosphatide wird über die Spaltprodukte der sauren und alkalischen Hydrolyse geführt. Da der DPI-K wasserunlöslich war, lösten wir jeweils 5-10 mg Substanz in wassergesättigtem Chloroform, emulgierten mit Säure oder Lauge, destillierten anschließend das Chloroform ab und führten die Hydrolyse durch. Hydrolysebedingungen und die danach gefundenen Spaltprodukte sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

T a b e l l e 6
Durchführung und Resultate der Hydrolysen

Nr.	Hydrolysierendes Agens	Hydrolyse-dauer	Temp.	Resultat
I	0.1 n Salzsäure	9 Std.	20°	keine Hydrolyse
II	5 n Salzsäure	10 Min.	100°	Fettsäuren, anorg.Phosphat, Glycerinphosphat, Inositdiphosphat u. Inosittriphosphat
III	6 n Salzsäure	6 Std.	100°	Fettsäuren, anorg.Phosphat u. Inosit
IV	6 n Salzsäure	24 Std. u. 2 Std.	100° 120°	wie Nr. III, dazu 5 Aminosäuren, darunter Alanin, Glykokoll und Leucin oder Isoleucin
V	Essigsäure 90%	15 Std.	37°	keine Hydrolyse
VI	0.03 n Natronlauge	20 Min.	37°	Fettsäuren, Glycerinphosphat, anorg. Phosphat, Inosittriphosphat und intakte Substanz
VII	1 n Natronlauge	24 Std.	20°	Anorg.Phosphat und Fettsäuren

- 76) R.M.C.DAWSON u. J.C.DITTMER, Biochem.J. 81, 540 (1961)
77) J.A.LOVERN u. J.OLLEY, Biochem.J. 55, 686 (1953)

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, wurde der DFI-K durch die Hydrolyse methode nicht verändert. Die Hydrolyse II mit 5n Salzsäure nach DAWSON und DITTMER⁷⁶⁾ lieferte papierchromatographisch G l y z e r i n p h o s p h a t , I n o s i t d i p h o s p h a t und eine dritte Phosphat und Inosit enthaltende Verbindung, bei der es sich vermutlich um ein Inosittriphosphat handelt. Die Hydrolyse mit 6 n Salzsäure nach einer Methode von LOVERN und OLLEY⁷⁷⁾ (III) führte vor allem zur Abspaltung von Inosit.

Ninhydrinpositive Substanzen wurden in diesem Hydrolysat noch nicht gefunden. Da der untersuchte DFI-K jedoch 0.26% Stickstoff enthielt und das Vorhandensein peptidartig gebundener Aminosäuren zu vermuten war, wurde die Salzsäurehydrolyse bei 100° 24 Stunden lang und anschließend bei 120° zwei Stunden durchgeführt, so daß mit einer totalen Hydrolyse aller evtl. vorhandenen Peptide zu rechnen war. Tatsächlich fanden wir jetzt 5 Aminosäuren. Die Behandlung der Substanz mit Essigsäure (Hydrolyseversuch V) nach DEBUCH⁷⁸⁾ ergab weder die Abspaltung von Plasmal, noch die Ausbildung von Lysoformen, wie dies mit Phosphatidylserin leicht gelingt. Hydrolyse VI erfolgte nach einer Vorschrift von DAWSON⁷⁹⁾. Neben einem erheblichen Anteil intakter Substanz fanden wir hierbei außer Fettsäuren und anorganischem Phosphat Spuren von Glycerinphosphat und einem weiteren Phosphorsäureester, wahrscheinlich Inosittriphosphat. Wie Tabelle 6 weiter zeigt, wurden nach Hydrolyse VII mit 1 n Lauge nur anorganisches Phosphat und Fettsäuren nachgewiesen.

Die I d e n t i f i z i e r u n g der Hydrolyseprodukte erfolgte auf papierchromatographischem Wege.

76) R.M.C.DAWSON u. J.C.DITTMER, Biochem.J. 81, 540 (1961)

77) J.A.LOVERN u. J.OLLEY, Biochem. J. 55, 686 (1953)

78) H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)

79) R.M.C.DAWSON, Biochem. J. 75, 45 (1960)

Das Hydrolysat wurde zunächst in die hydrophile und die hydrophobe Fraktion aufgetrennt. Fettsäuren konnten durch Ausschütteln des sauren Hydrolysates mit Äther oder Chloroform gewonnen werden. Die wasserlöslichen Bestandteile verblieben in der hydrophilen Phase. Die i n t a k t e n P h o s p h a t i d e befanden sich in der Äther- oder Chloroformausschüttelung. Ihre Identifizierung erfolgte durch Chromatographie auf Formaldehydpapier.

I n o s i t war am besten nach Hydrolyse III nachweisbar. Die Identifizierung der Substanz erfolgte durch 2-dimensionale Papierchromatographie im System Isopropanol/Eisessig/Wasser (R_f 0.185) und Butanol/Eisessig/Wasser (R_f 0.095) und Besprühen der entwickelten Chromatogramme mit ammoniakalischer Silbernitratlösung.

Dasselbe Verfahren benutzten wir auch, um Inosit in b e i d e n Komponenten des DPI-K nachzuweisen. Dazu trennten wir den DPI-K chromatographisch auf, eluierten die ausgeschnittenen Chromatogrammstellen mit Chloroform/Äthanol/Wasser, hydrolysierten die Eluate nach Methode III (Tabelle 6) und führten den Nachweis wie oben durch. Inosit konnte in b e i d e n Substanzen des DPI-K gefunden werden.

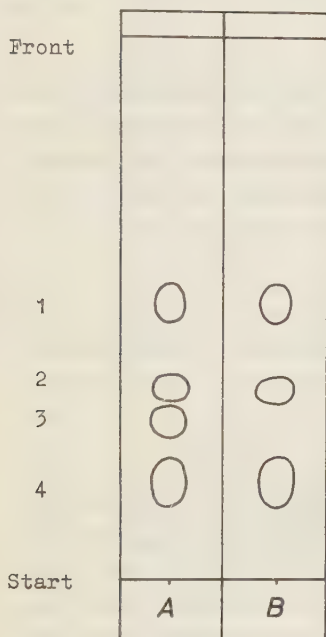
G l y z e r i n p h o s p h a t und I n o s i t p h o s - p h a t e werden vorwiegend durch die salzsaure Hydrolyse II und die milde alkalische Hydrolyse VI (Tabelle 6) abgespalten. Wir trennten die Hydrolysate nach Entfernung von Salzsäure bzw. Alkaliionen durch Papierchromatographie nach der Methode von DESJOBERT und PETEK⁸⁰⁾ mit dem Fließmittel n-Propanol/Ammoniak/Wasser auf und fanden durch Anfärbung mit dem Reagenz nach HANES und ISHERWOOD⁸¹⁾ folgende, in Abb. 5 schematisch dargestellte Substanzen.

80) A.DESJOBERT u. F.PETEK, Bull.soc.chim.biol. 38, 871 (1956)

81) C.S.HANES u. F.A. ISHERWOOD, Nature (London) 164, 1107 (1949)

Abb. 5

Chromatogrammschema der phosphorhaltigen Spaltprodukte



Fließmittel:

n-Propanol/Ammoniak (25%)/
Wasser (5:4:1),
absteigend (35 cm) auf
Schleicher u. Schüll-Papier

Anfärbemittel:

Ammoniummolybdat-
Perchlorsäure

A = Hydrolysat mit 5 n
Salzsäure

B = Hydrolysat mit 0.03 n
Natronlauge

Fleck 1 ($R_f = 0.51$) der Abb. 5 wurde in beiden Hydrolysaten in geringen Mengen gefunden und konnte an Hand von Testsubstanz als G l y z e r i n p h o s p h a t identifiziert werden.

Fleck 2 ($R_f = 0.35$) wurde als a n o r g a n i s c h e s P h o s p h a t identifiziert. Es unterscheidet sich gut von Phosphorsäureestern, da es im Gegensatz zu diesen sofort nach dem Besprühen mit der Reagenzlösung zitronengelb gefärbt wird.

Fleck 3 ($R_f = 0.29$) stimmt in der Laufhöhe weitgehend mit den von DESJOBERT und PETEK⁸²⁾, GRADO und BALLOU⁸³⁾ sowie KERR und KFOURY⁸⁴⁾ angegebenen Werten für Inositdiphosphat überein und wurde nur nach der sauren Hydrolyse (A) gefunden.

Fleck 4 ($R_f = 0.18$) der Abb. 5 könnte mit Inosittriphosphat identisch sein, nachdem die obigen Autoren für diese Verbindung nahezu analoge R_f -Werte ermittelt hatten. Im System Phenol/Wasser/Eisessig/Äthanol verhielt sich diese Substanz wie von DAWSON und DITTMER⁸⁵⁾ beschrieben.

Diese Befunde deuten daraufhin, daß der DPI-K Inositdiphosphat, Inosittriphosphat und Glycerinphosphat enthält und es ist wahrscheinlich, daß diese Bausteine teils einem Diphosphoinositid, teils einem Triphosphoinositid zuzuordnen sind.

Den qualitativen Nachweis auf F e t t s ä u r e n führt man zweckmäßigerweise nach der Hydrolyse mit 6 n Salzsäure (III). Die Fraktionierung in gesättigte und ungesättigte Verbindungen wurde durch Ausfrieren der gesättigten Anteile vorgenommen. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte chromatographisch nach POKORNY⁸⁶⁾. Zur Anfärbung der Chromatogramme diente Kupferacetat-Kaliumferrocyanid und Osmiumtetroxyd. Wir fanden, daß der Fettsäureanteil des DPI-K überwiegend aus gesättigten Säuren gebildet wird. Deren Hauptanteil wiederum bestand aus S t e a r i n s ä u r e . Daneben war P a l m i t i n s ä u r e enthalten. Die ungesättigten Fettsäuren setzten sich aus Ö l s ä u r e , L i n o l s ä u r e und L i n o l e n s ä u r e zusammen.

82) A.DESJOBERT u. F.PETEK, Bull.soc.chim.biol. 38, 871 (1956)

83) C.GRADO u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 236, 54 (1961)

84) S.E.KERR u. G.A.KFOURY, Arch.Biochem.Biophysics 96, 347 (1962)

85) R.M.C.DAWSON u. J.C.DITTMER, Biochem.J. 81, 540 (1961)

86) J.POKORNY, Naturwissenschaften 43, 375 (1956)

G l y z e r i n konnte in keinem dieser Hydrolysate einwandfrei nachgewiesen werden, da es bei den angewandten Hydrolysebedingungen größtenteils zerstört wird. Außerdem stören kleinste Restmengen von Säure oder Alkali, deren quantitative Entfernung sehr schwierig ist. Deshalb entwickelten wir eine brauchbare Hydrolysemethode, die sich an ein großtechnisches Verfahren der Glyzeringewinnung aus Fetten anlehnt. Nach RADFANG⁸⁷⁾ erfolgt die Wasserspaltung der Fette unter Druck und mit Zinkoxyd als Katalysator. Bei unseren Versuchen fand jedoch nach HENGLEIN⁸⁸⁾ anstelle des Zinkoxyds ein Gemisch aus Zinkoxyd und Zinkstaub Verwendung.

Zur Hydrolyse des DPI-K wurde das Gemisch aus Phosphatid, Katalysator und Wasser im verschlossenen Ampullenglas 3 Std. auf 160° erhitzt. Die papierchromatographische Untersuchung des Eluates erfolgte mit Isopropanol/Eisessig/Wasser als Fließmittel und der Anfärbemethode nach WOLFROM und MILLER⁸⁹⁾. Dadurch konnte Glyzerin als Bestandteil des DPI-K einwandfrei nachgewiesen werden. Die Methode war auch zum Glyzerinnachweis in anderen Phosphatiden, wie Phosphatidyläthanolamin oder Phosphatidylserin, geeignet.

Die A m i n o s ä u r e n wurden durch 2-dimensionale Papierchromatographie mit Phenol/Wasser und Butanol/Eisessig/Wasser aufgetrennt. Die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrinreagenz nach CONSDEN und Mitarbeitern⁹⁰⁾. Wir fanden 5 Aminosäuren, darunter A l a n i n , G l y k o k o l l und L e u c i n oder I s o l e u c i n .

Nachdem diese Aminosäuren weder in der intakten Substanz noch nach 6stündiger salzsaurer Hydrolyse gefunden worden waren, müssen sie im DPI-K in sehr stabiler Bindung, evtl. in Form cyclischer Peptide, vorliegen.

87) H. RADFANG, Seifen, Öle, Fette, Wachse 79, 250 (1953)

88) F. A. HENGLEIN, Grundriß der chem. Technik, Weinheim/Bergstr. u. Berlin S. 490 (1949)

89) M. L. WOLFROM u. J. B. MILLER, Anal. Chem. 28, 1037 (1956)

90) R. CONSDEN, A. H. GORDON u. A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 38, 224 (1944)

b) Enzymatische Hydrolyse

Nach bisherigen Untersuchungsergebnissen existieren von allen Diacylphosphatiden auch entsprechende Lysoverbindungen.

ACKER⁹¹⁾ spaltet mittels Bienengift, dessen Phospholipase A α -ständige Fettsäuren angreift, Lecithin und Phosphatidyläthanolamin zur Lysoform auf. HÖLZL⁹²⁾ konnte eine 50%ige Umwandlung von Monophosphoinositid und Phosphatidylserin in die Lysoform erzielen. Diese enzymatische Hydrolyse wurde bisher in ätherischer Lösung durchgeführt, wobei der Äther im Sinne eines Fermentaktivators⁹³⁾ fungieren sollte. Durch Veränderung der bekannten Versuchsbedingungen erhielten wir bei Phosphatidylserin und Monophosphoinositid eine quantitative Umwandlung in die Lysoform. Dazu versetzten wir die 5%ige ätherische Lösung der beiden Phosphatide 12 Stunden mit dem gleichen Anteil einer 0.75%igen Lösung von Bienengift in einem Veronal-Na/Salzsäure-Puffer (pH 7.5). Die Prüfung auf Lysoformen erfolgte anhand einer papierchromatographischen Methode von HÖRHAMMER, WAGNER und RICHTER⁹⁴⁾.

Da der DPI-K in Äther kaum löslich ist, konnte seine Spaltbarkeit durch Bienengift nicht in analoger Weise geprüft werden. Ein geeignetes Lösungsmittel für die Substanz stellt wassergesättigtes Chloroform dar. Da die Phospholipase A-Aktivität in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln außer Äther unbekannt ist⁹⁵⁾, wurde zunächst die Spaltung von Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Phosphatidyläthanolamin mit Bienengift bei Anwesenheit von Chloroform untersucht. Eine 1%ige Lösung der genannten Phosphatide in Chloroform wurde mit dem gleichen Volumen einer 0.3%igen Bienengiftlösung in einem Veronal-Na/Acetat-Puffer (pH 8.4) inkubiert. Nach 12 Stunden waren diese

91) L. ACKER, Angew. Chem. 68, 560 (1956)

92) J. HÖLZL, Dissertation München (1959)

93) D. J. HANAHAN, J. biol. Chemistry 195, 199 (1952)

94) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. G. RICHTER, Biochem. Z. 331, 155 (1959)

95) M. KATES in K. Bloch (Editor), Lipide Metabolism, John Wiley u. Sons, New York-London, p. 188 (1960)

Phosphatide zu den entsprechenden Lysoformen aufgespalten. Damit bestätigt sich ein Befund von DAVIDSON und LONG⁹⁶⁾, daß eine Phospholipase durch Chloroform bei gleichzeitiger Anwesenheit von Äther aktiviert wird. Aus unserem Versuch ergibt sich nun weiter, daß eine Phospholipase A auch in reinem Chloroform ihre volle Wirkung entfaltet.

Während die Diacylverbindungen Monophosphoinositid, Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin unter den genannten Bedingungen eine vollständige Spaltung erfuhren, wurde der DPI-K nicht angegriffen.

c) Quantitative Bestimmung der Elemente und Spaltprodukte des Diphosphoinositidkomplexes und Diskussion

Von dem DPI-K wurden nun Stickstoff-, Phosphor- und Inositolwerte, sowie die Estervergleichszahlen und der Gehalt an Plasmal und Fettsäuren bestimmt. Zum Vergleich ermittelten wir die gleichen Werte auch von Folch 1-Fraktion und Ätherextrakt des Rinderhirns.

Den Gesamtp h o s p h o r der Substanzen ermittelten wir nach dem Verfahren von LOWRY und Mitarbeitern⁹⁷⁾, das von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER⁹⁸⁾ modifiziert wurde.

Die Bestimmung des Gesamts t i c k s t o f f s wurde volumetrisch nach dem Verfahren von DUMAS durchgeführt.

Die I n o s i t b e s t i m m u n g erfolgte auf mikrobiologischem Weg, wobei wir auf der Grundlage der von SNELL⁹⁹⁾ entwickelten und von McKIBBIN¹⁰⁰⁾ in einigen Punkten modifizierten Methode mit dem Hefestamm Saccharomyces carlsbergensis arbeiteten.

96) F.M.DAVIDSON u. C.LONG, Biochem.J. 69, 458 (1958)

97) O.H.LOWRY, N.R.ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING WU u.A.L.FARR, J.biol.Chemistry 207, 1 (1954)

98) H.WAGNER, A.LISSAU, J.HÖLZL u.L.HÖRHAMMER, J.Lipid Research 3, 177 (1962)

99) E.E.SNELL in P.György (Editor), Vitamin Methods, Vol.I, Academic Press, New York, p. 445 (1950)

100) J.M.McKIBBIN in D.Glick (Editor), Methods of Biochemical Analysis, Vol.III, Interscience Publishers, New York, p. 119 (1959)

Dazu war primär eine Hydrolyse des DPI-K erforderlich, da das Inosit nur in freier Form als Vitamin wirksam sein kann. Um eine totale Hydrolyse der Inositphosphatester zu erzielen, wurde bei 120° mit 4 n Salzsäure im Pyrexglas gespalten. Inosit wird nach Untersuchungen von BÖHM und RICHARZ¹⁰¹⁾ unter diesen Bedingungen nicht zerstört. Fettsäuren werden durch Ausschütteln und Salzsäure durch Destillation entfernt. Die Auswertung erfolgte bei Inositmengen zwischen 1 µg und 6 µg pro 11 ml Ansatz mit Hilfe von Blindlösungen und Testlösungen von bekanntem Inositgehalt.

Die Bestimmung des P l a s m a l g e h a l t e s erfolgte nach einer modifizierten Methode von FEULGEN und Mitarbeitern¹⁰²⁾. Die Substanz wurde dazu in Eisessig gelöst, mit Salzsäure gespalten, das abgespaltene Plasmal in fuchsin-schwefliger Säure zur Reaktion gebracht und die auftretende Färbung im Zeiss-Spektralphotometer bei 546 mµ gemessen. Als Vergleichssubstanzen standen Stearinaldehyd und Palmitinaldehyd zur Verfügung.

Die Bestimmung der E s t e r v e r g l e i c h s z a h l erfolgte nach SNYDER und STEPHENS¹⁰³⁾, die das ursprüngliche Verfahren von RAPPORT und ALONZO¹⁰⁴⁾ verbessert hatten, während der Gehalt an F e t t s ä u r e n nach einer gravimetrischen Methode von HÖRHAMMER, WINTERSBERGER u. WAGNER¹⁰⁵⁾ ermittelt wurde.

In der folgenden Tabelle 7 sind die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen zusammengefaßt.

-
- 101) P.BÖHM u. G.RICHARZ, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 298, 110 (1954)
102) R.FEULGEN, W.BOGUTH u. G.ANDRESEN, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 287, 90 (1951)
103) F.SNYDER u. N.STEPHENS, Biochim.biophysica Acta 34, 244 (1959)
104) M.M.RAPPORT u. N.ALONZO, J.biol.Chemistry 217, 193 (1955)
105) L.HÖRHAMMER, F.WINTERSBERGER u. H.WAGNER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 545 (1959)

T a b e l l e 7

Ergebnisse der quantitativen Untersuchung von Elementen und Spaltprodukten des Diphosphoinositidkomplexes, des Ätherextraktes und der Folch 1-Fraktion des Rinderhirns

Analysierte Substanz	Gesamtphosphor in %	Gesamtstickstoff in %	Inosit in %	Plasmal in %	Estervergleichszahl	Fettsäuren in %
DPI-K	7.18	0.26	14.94	1.82	1233	30
Ätherextrakt	2.64	1.64	-	-	1026	-
Folch 1-Fraktion	5.1	1.55	5.13	4.87	1146	44

Da in der Literatur zahlreiche Analysenergebnisse über Diphosphoinositidfraktionen bzw. den DPI-K verschiedenen Reinheitsgrades vorliegen, haben wir diese in der folgenden Tabelle 8 zusammengestellt und mit den wichtigsten aus unserer Substanz ermittelten analytischen Daten vergleichen.

T a b e l l e 8

Vergleich analytischer Ergebnisse

Diphosphoinositide isoliert und analysiert durch:	Gesamtphosphor in %	Inosit in %	Phosphor : Inosit molares Verhältnis	Gesamtstickstoff in %
FOLCH ¹⁰⁶⁾	7.3	21.0	2:1	0.4 - 0.6
GRADO u. BALLOU ¹⁰⁷⁾	6.5	12.0	3.1:1	0.3
eigene Untersuchung	7.18	14.94	2.7:1	0.26
DITTMER u. DAWSON ¹⁰⁸⁾	8.6 ^{*)}	16.4 ^{*)}	3:1 ^{*)}	0 - 0.31 ^{*)}
DITTMER u. DAWSON ¹⁰⁸⁾	-	-	2.6:1 ^{**)}	-
HÖLZL ¹⁰⁹⁾	8.34	-	-	-

*) Diese Werte wurden aus Triphosphoinositid ermittelt.

**) Dieses Phosphor : Inosit-Verhältnis wurde von DITTMER u. DAWSON für eine Phosphatid-Peptidfraktion des Rinderhirns ermittelt.

106) J. FOLCH, J. biol. Chemistry 177, 505 (1949)

107) C. GRADO u. C. E. BALLOU, J. biol. Chemistry 236, 54 (1961)

108) J. C. DITTMER u. R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 81, 535 (1961)

109) J. HÖLZL, Dissertation München (1959)

Eine relativ gute Übereinstimmung zeigen die Phosphorwerte der Diphosphoinositide mit 7.3%, 6.5% und 7.18%. Dagegen differieren die Inositwerte der verschiedenen Präparate außerordentlich stark. Wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist, fand FOLCH 21% Inosit in der Diphosphoinositidfraktion, während GRADO und BALLOU nur 12% Inosit in der nach der gleichen Methode isolierten Substanz nachwiesen.

Dieser Unterschied ist schwer erklärbar, da beide Autoren die analysierte Substanz nach dem gleichen fraktionierten Fällungsverfahren isoliert hatten.

Ebenso voneinander differierende Werte ergeben sich, wenn man die molaren Phosphor:Inosit-Verhältnisse der Diphosphoinositide ermittelt. Während DITTMER und DAWSON¹¹⁰⁾ für das von ihnen isolierte Triphosphoinositid als molares Verhältnis Phosphor:Inosit 3:1 angeben, fanden wir für den DPI-K ein molares Verhältnis von Phosphor:Inosit = 2.7:1. Dieses Ergebnis läßt sich in die neueren Vorstellungen über die Zusammensetzung des Diphosphoinositidkomplexes einordnen. Man kann annehmen, daß in dieser von uns isolierten Substanz ein Gemisch von mehreren Inositphosphatiden vorliegt, deren Phosphor:Inosit-Verhältnis teils 3:1, teils 2:1 beträgt.

Wie die Tabelle 8 weiter zeigt, ermittelten GRADO und BALLOU¹¹¹⁾ sowie FOLCH¹¹²⁾ molare Phosphor:Inosit-Verhältnisse, die sich vor allem untereinander, aber auch gegenüber dem Verhältnis 2.7:1 erheblich unterschieden. FOLCH fand, daß sich Phosphor:Inosit wie 2:1 verhalten, während GRADO und BALLOU für die analoge Substanz die Beziehung 3.1:1 ermittelten. Vor allem der letztgenannte Quotient erscheint zunächst auffallend hoch, wenn man berücksichtigt, daß das durch fraktionierte Fällung gewonnene "Diphosphoinositid" neben Triphosphoinositid auch Monophosphoinositid enthält. Eine mögliche Erklärung für diesen außerordentlich hohen molaren Phosphoranteil ergibt sich wohl aus einer

110) J.C.DITTMER u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 81, 535 (1961)

111) C.GRADO u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 236, 54 (1961)

112) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 505 (1949)

Verunreinigung durch Phosphatidylserin. DAWSON und DITTMER¹¹³⁾ fanden in einer durch 10 Methanolfällungen gewonnenen Diphosphoinositidfraktion noch 32% Phosphatidylserin. Wenn man annimmt, daß sowohl die von FOLCH als auch die von GRADO und BALLOU analysierte Substanz 32% Phosphatidylserin enthalten hat, würde sich der Quotient des molaren Phosphor:Inosit-Verhältnisses auf 1.18:1 bzw. auf 1.8:1 erniedrigen.

Das von FOLCH ermittelte molare Verhältnis Phosphor:Inosit = 2:1, welches unter Berücksichtigung des Phosphatidylserins noch geringer wäre, deutet darauf hin, daß die untersuchte Diphosphoinositidfraktion kein Triphosphoinositid mehr enthielt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß FOLCH nur Inositdiphosphat als Spaltprodukt fand. Es besteht die Möglichkeit, daß eine neuerdings von BROCKERHOFF und BALLOU¹¹⁴⁾ und von THOMPSON und DAWSON¹¹⁵⁾ erörterte Phosphatase des Gehirns, die einen Abbau von Triphosphoinositid zu Monophosphoinositid über Diphosphoinositid als Zwischenstufe bewirkt, das Triphosphoinositid bereits abgebaut hatte. GRADO und BALLOU¹¹⁶⁾ geben aber an, daß ein 3 Tage lang bei 5°-10° aufbewahrtes Gehirn gegenüber einem sofort aufgearbeiteten Gehirn kaum Unterschiede in der Zusammensetzung der Diphosphoinositidfraktion aufwies. Unsere eigenen Beobachtungen weisen auf eine durchaus mögliche Veränderung des DPI-K infolge einer ungeeigneten Aufarbeitungsmethode hin. Ein homogenisiertes Frischhirn, das ohne vorherige Gefrieretrocknung 3 Tage lang bei Zimmertemperatur mit Aceton und Äther extrahiert worden war, zeigte nach Isolierung des DPI-K nur noch das Diphosphoinositid 1 (R_f 0.37). Das dem Triphosphoinositid entsprechende Diphosphoinositid 2 war papierchromatographisch nicht mehr nachzuweisen. Nach BROCKERHOFF und BALLOU ist für die Aktivität der Gehirns-

113) R.M.C.DAWSON u. J.C.DITTMER, Biochem.J. 81, 540 (1961)

114) H.BROCKERHOFF u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 237, 1764 (1962)

115) W.THOMPSON u. R.M.C.DAWSON, Biochem. J. 83, 5 P (1962)

116) C.GRADO u. C.E.BALLOU, J.biol.Chemistry 236, 54 (1961)

enzyme nicht nur die Temperatur, sondern auch der Zerkleinerungsgrad des Gewebes verantwortlich.

Schwer erklärbar war die Tatsache, daß die von uns isolierte Substanz Stickstoff enthielt. Der Gehalt lag mit 0.26% unter den in anderen Diphosphoinositidfraktionen gefundenen Werten. Weder freie Aminosäuren noch Phosphatidylserin, die in unserer Substanz nachweislich nicht mehr vorhanden waren, konnten dafür verantwortlich gemacht werden. Nach 26stündiger salzsaurer Hydrolyse fanden wir 5 Aminosäuren, die vor der Spaltung vermutlich in Form schwer hydrolysierbarer, mit Ninhydrin nicht reagierender, cyclischer Peptide am DPI-K hafteten. Wie aus Arbeiten von DITTMER und DAWSON¹¹⁷⁾, sowie HUGGINS und COHN¹¹⁸⁾ hervorgeht, besteht Grund zu der Annahme, daß sowohl der DPI-K als auch andere Phosphatide im Gewebe an Protein-ähnliche Komponenten gebunden sind. Wir halten es nicht für ausgeschlossen, daß bei der Extraktion einzelne Peptidreste an den Phosphatiden gebunden bleiben. Möglicherweise besteht zwischen dem vorliegenden DPI-K und der von FOLCH¹¹⁹⁾ sowie LEBARON und FOLCH¹²⁰⁾ gefundenen Verbindungsklasse der Phosphatid-Peptide ein Zusammenhang. Allerdings kann nur ein kleiner Anteil der vorliegenden Substanz mit derartigen stickstoffhaltigen Resten behaftet sein, da bei einem Stickstoffgehalt von 0.26% nur auf ca. jedes 5. Phosphatidmolekül ein Aminosäuremolekül treffen würde.

Die Untersuchung des DPI-K auf Fettsäuren ergab, daß in Übereinstimmung mit HÖRHAMMER, WAGNER und HÖLZL¹²¹⁾ sowie KEMP und Mitarbeitern¹²²⁾ die Stearinsäure

-
- 117) J.C.DITTMER u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 81, 535 (1961)
118) C.G.HUGGINS u. D.V.COHN, J.biol.Chemistry 234, 257 (1958)
119) J.FOLCH, in W.D.McElroy u. H.B.Glass (Editors), Phosphorus metabolism, Vol. II, Johns Hopkins Press, Baltimore, p.186 (1952)
120) F.N.LEBARON u. J.FOLCH, J.Neurochem. 1, 101 (1956)
121) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)
122) P.KEMP, J.N.HAWTHORNE, H.G.SAMMONS u. R.B.ELLIS, in P. Desnuelle (Editor), The Enzymes of Lipid Metabolism, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, p. 43 (1961)

einen wesentlichen Anteil der Fettsäurekomponenten darstellt. Weiterhin fanden wir P a l m i t i n s ä u r e in der Fraktion der gesättigten Fettsäuren. Der Gehalt des DPI-K an ungesättigten Fettsäuren ist gering. Während KEMP und Mitarbeiter in der nach FOLCH isolierten Substanz nur Ölsäure fanden, wiesen wir Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure nach. Da diese Bausteine jedoch nur in geringer Menge vorhanden sind, dürfte sich daraus die relativ gute Haltbarkeit des DPI-K erklären.

Die Estervergleichszahl des DPI-K wurde mit 1233 ermittelt und liegt unter der Estervergleichszahl des Diacylphosphatids Phosphatidyläthanolamin, deren Wert 1763 betrug. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu der Auffassung, daß im DPI-K Esterphosphatide vorliegen.

Der Plasmalgehalt des DPI-K von 1.82% ist niedriger als der durchschnittliche Plasmalgehalt der Phosphatide. Möglicherweise läßt sich der Befund, daß DPI-K von Essigsäure nicht angegriffen wird, damit erklären.

Auf Grund unserer bisherigen Untersuchungen kann angenommen werden, daß der DPI-K aus inosithaltigen Glycerophosphatiden besteht, nachdem wir die Bausteine Glycerin, Phosphat, Fettsäuren und Inosit, sowie das Vorhandensein von Esterbindungen eindeutig nachweisen konnten. Die Tatsache, daß wir mit Phospholipase A keine Aufspaltung zur Lysoform erzielen konnten, steht allerdings in einem gewissen Widerspruch zu der Vorstellung, daß es sich bei dem DPI-K um normale Esterphosphatide handeln könnte. Weiterhin ist auf Grund unserer Arbeiten die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß in dem DPI-K neben Diphosphoinositid (DPI 1) ein Triphosphoinositid (DPI 2) vorliegt. Hinweise dafür liefert neben dem Inosit:P-Verhältnis 2.7:1 das Auftreten mehrerer phosphorhaltiger Hydrolyseprodukte, von denen zwei im R_f -Wert mit Inositdiphosphat und Inosittriphosphat übereinstimmten. Es ist möglich, daß diese beiden Substanzen aus Triphosphoinositid und Diphosphoinositid abgespalten wurden.

Die Frage, welche der beiden Komponenten des DPI-K einem Triphosphoinositid zuzuordnen wäre, läßt sich aus dem papierchromatographischen Vergleich des DPI-K mit dem Monophosphoinositid ableiten. Das Monophosphoinositid besitzt von allen Inositphosphatiden den höchsten R_F -Wert. Dem Diphosphoinositid müßte dann der R_F -Wert 0.37 und einem Triphosphoinositid der R_F -Wert 0.3 entsprechen. Einen Hinweis für die Richtigkeit dieser Theorie erhielten wir durch eine Verteilung des DPI-K nach DITTMER und DAWSON¹²³⁾ in dem System Chloroform/Äthanol/Äther/Wasser. Die genannten Autoren benutzten dieses Verfahren zur Isolierung des Triphosphoinositids aus einer Inositidfraktion. Wir erhielten dadurch zwar keine Isolierung, doch konnte eine Anreicherung der hydrophileren Komponente des DPI-K ($R_F = 0.3$) in den Oberphasen der Verteilung beobachtet werden. Da nach DITTMER und DAWSON in diesen Phasen das Triphosphoinositid vorliegen soll, war anzunehmen, daß die angereicherte Substanz mit Triphosphoinositid identisch ist. Der papierchromatographische Vergleich des vorliegenden DPI-K mit einem Triphosphoinositid^{*)} nach DITTMER und DAWSON ergab eine weitgehende Übereinstimmung der beiden Substanzen.

¹²³⁾ J.C.DITTMER u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. **81**, 535 (1961)

^{*)} Wir danken Herrn Professor R.M.C.DAWSON, Babraham, Cambridge, für die freundliche Überlassung einer Probe Triphosphoinositid.

IV. Quantitative Bestimmung der einzelnen Phosphatide von Äther-
extrakt, Folch 1-Fraktion und Diphosphoinositidkomplex nach
papierchromatographischer Auftrennung

Da bisher für die Darstellung des DPI-K immer von Folch 1-Frak-
tionen ausgegangen wurde, war die quantitative Verteilung der
einzelnen Phosphatide in diesen Extrakten von Interesse. Ver-
gleichend dazu haben wir auch die Phosphatide im Ätherextrakt,
der von uns als Ausgangsmaterial verwendet wurde, sowie die bei-
den Komponenten des DPI-K über ihre Phosphorwerte bestimmt. Da-
für stand ein neues Verfahren nach WAGNER, LISSAU, HÖLZL und
HÖRHAMMER¹²⁴⁾ zur Verfügung, das die Auftrennung der i n -
t a k t e n Phosphatide mittels Chromatographie auf Formalde-
hydpapier, die anschließende nasse Veraschung der Chromatogramm-
flecken und direkte Bestimmung der Phosphorwerte aus dem Ver-
aschungsgemisch gestattet. Zur Anfärbung der papierchromatogra-
phisch aufgetrennten Phosphatide diente Ammoniummolybdat-Perchlor-
säure-Reagenz.

In der folgenden Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser Untersu-
chungen zusammengestellt. Der Phosphatidgehalt errechnet sich
aus den Phosphorwerten unter Verwendung eines Umrechnungsfaktors.
Dieser ergibt sich als Quotient aus dem Molekulargewicht und dem
Phosphoranteil des jeweiligen Phosphatids.

124) H.WAGNER, Ä.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, J.Lipid Research 3,
177 (1962)

T a b e l l e 9

Quantitative Bestimmung der einzelnen Phosphatidkomponenten von
Ätherextrakt, Folch 1-Fraktion und Diphosphoinositidkomplex

Phosphatid	% Phosphor	Molekular- gewicht	% Phospha- tid (ber.)
I. Untersuchte Substanz: Ätherextrakt			
Phosphatidylcholin(Lecithin)/ Phosphatidyläthanolamin	1.879	775	47.0
Phosphatidylserin	0.456	790	11.6
Monophosphoinositid	0.087	860	2.41
Diphosphoinositid 1	0.025	950	0.382
Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)	0.021	1050	0.237
anorganisches Phosphat	0.255	125	1.02
II. Untersuchte Substanz: Folch 1-Fraktion			
Phosphatidyläthanolamin	0.64	750	15.5
Phosphatidylserin	1.533	790	39.0
Monophosphoinositid	0.448	860	12.4
Diphosphoinositid 1	0.209	950	3.2
Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)	0.347	1050	3.91
anorganisches Phosphat	1.611	125	6.4
III. Untersuchte Substanz: Diphosphoinositidkomplex			
Diphosphoinositid 1	2.569	950	39.3
Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)	4.269	1050	48.2
anorganisches Phosphat	0.23	125	0.92

Anmerkung: Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die untersuchte Substanz.

Wie Tabelle 9 (I) zeigt, besteht der Ätherextrakt fast zur Hälfte aus einem Gemisch Lecithin/Phosphatidyläthanolamin, während Phosphatidylserin mit 11.6%, Monophosphoinositid mit 2.41% und der DPI-K mit ca. 0.6% vertreten sind. Die Folch 1-Fraktion (Tabelle 9 (II)) enthält nur noch 15.5% Phosphatidyläthanolamin und praktisch kein Lecithin mehr. Dieses wurde durch die Folch 1-Fällung bis auf ca. 0.1% entfernt. Sämtliche anderen Phosphatide waren in der Folch 1-Fraktion gegenüber dem Ätherextrakt erheblich angereichert. So fanden wir eine Zunahme des Phosphatidylserins um das 3 1/2fache, des Monophosphoinositids um das 5fache und des DPI-K um das rund 10fache. Tabelle 9 (III) zeigt, daß der DPI-K zu mehr als der Hälfte aus Triphosphoinositid besteht, vorausgesetzt, daß die von uns für ein Stearyl-Palmityl-Diphosphoinositid und für ein Stearyl-Palmityl-Triphosphoinositid berechneten Molekulargewichte annähernd den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen. Anorganisches Phosphat ist mit 6.4% am stärksten in der Folch 1-Fraktion vertreten und konnte aus dem DPI-K zum größten Teil entfernt werden.

B. Über das Vorkommen und den Nachweis des Diphosphoinositidkomplexes
in den Säugetierorganen Herzmuskel, Lunge, Leber, Milz und Niere

Während über das Vorkommen des Monophosphoinositids in verschiedenen tierischen Organen, wie z.B. Herzmuskel¹²⁵⁾, Leber¹²⁶⁾, Niere¹²⁷⁾ und Gehirn¹²⁸⁾ ausführlich berichtet wurde, ist bis heute weder bekannt noch geklärt, ob der DPI-K auch in anderen Organen außer dem Gehirn enthalten ist. Wenn die Anwesenheit dieser Substanz auf ein Organ, nämlich das Gehirn, begrenzt wäre, dann würde dies eine Ausnahme bei der Phosphatidzusammensetzung darstellen. Daher führten wir Untersuchungen über das Vorkommen des DPI-K im Herzmuskel, in der Lunge, Leber, Milz und Niere durch.

Wenn überhaupt zu erwarten war, daß der DPI-K in diesen Organen vorkommt, dann dürfte er vermutlich nur in sehr geringen Konzentrationen auftreten, da er bisher noch nicht entdeckt wurde. Deshalb war ein Nachweis des DPI-K mit den herkömmlichen Methoden der Chromatographie von vornherein sehr fraglich. Eine äußerst empfindliche und in diesem Fall erfolgversprechende Nachweismethode besteht in dem Einbau von ³²P-Phosphat in die Phosphatide und in anschließender Autoradiographie.

Dazu erhielten männliche Ratten ³²P-Phosphat durch subcutane Injektion verabreicht. Nach 24 Stunden Einbauzeit wurden die Tiere getötet. Aus den lyophilisierten und entfetteten Organen wurden die Ätherextrakte hergestellt. Diese Extrakte chromatographierten wir absteigend auf Formaldehydpapier und stellten die Autoradiogramme her, wobei eine Expositionszeit von 3 Tagen ausreichend war.

Auf Grund dieser orientierenden Voruntersuchungen enthalten alle oben genannten Organe außer Monophosphoinositid noch weitere Inosithosphatide. Im Falle von Ratten l u n g e , - l e b e r und h e r z fanden wir zwei Komponenten. Diese stimmen mit den Di-

125) M. FAURE u. M. J. MORELEC-COULON, Bull. soc. chim. biol. 40, 1067 (1958)

126) J. M. McKIBBIN, J. biol. Chem. 220, 537 (1956)

127) R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 75, 45 (1960)

128) L. HÖRHALTER, H. WAGNER u. J. HÖLZL, Biochem. Z. 330, 591 (1958)

phosphoinositiden 1 und 2 des Rattenhirns papierchromatographisch, in ihrer Löslichkeit und hinsichtlich ihres Verhaltens bei der multiplikativen Verteilung überein. Dagegen konnten wir in N i e r e und M i l z der Ratte nur eine Substanz auffinden, die dem Diphosphoinositid 1 des Rattenhirns entsprach. Die aus mehreren Chromatogrammen ermittelten R_F -Werte betrugen 0.37 für Diphosphoinositid 1 und 0.3 für Diphosphoinositid 2. In jeder dieser Komponenten konnte Inosit und Phosphat nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung der papierchromatographischen Befunde über das Vorkommen des DPI-K versuchten wir, die Substanz aus den Rinderorganen Lunge, Herz und Leber zu isolieren.

Eine Isolierung oder auch nur Anreicherung des DPI-K nach der Methode von FOLCH¹²⁹⁾ gelang nicht. Statt dessen erhielten wir eine weiße, voluminöse, phosphorarme Substanz, die weder mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäurereagens, noch mit Ninhydrinlösung reagierte und bei der Papierchromatographie auf Formaldehydpapier mit den üblichen Lipoidfließmitteln am Startpunkt sitzen blieb.

Dagegen erwies sich das von uns entwickelte und zur Isolierung des Rinderhirn-DPI-K verwendete Verfahren als brauchbar. Als geeignetes Organ für die Isolierung des DPI-K erschien die Lunge, da es relativ wenig störende Begleitsubstanzen enthält.

Kaninchen- und Rinderlunge wurden in analoger Weise zu dem für Rinderhirn ausgearbeiteten Verfahren gefriergetrocknet, mit Aceton und Äther extrahiert, der Ätherextrakt nach FOLCH vorfraktioniert und die gewonnene Folch 1-Fraktion über 15 Schütteltrichterstufen verteilt. Die Entfernung wasserlöslicher Bestandteile erfolgte mit der Zellsäure.

Die isolierte Substanz bestand aus zwei chromatographisch auftrennbaren Komponenten, die in R_F -Wert und Löslichkeit mit dem DPI-K des Rinderhirns übereinstimmten. Tabelle 10 zeigt die Ausbeuten des Isolierungsganges bei Kaninchen- und Rinderlunge.

129) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 497 (1949)

T a b e l l e 10

Ausbeuten bei der Isolierung aus Kaninchen- und Rinderlunge

Organ bzw. Extrakt	Ausbeuten aus Kaninchenlunge	Ausbeuten aus Rinderlunge
Frischorgan	23.0 g	1250 g
Gefriergetrocknetes Organ	4.5 g	240 g
Ätherextrakt	0.12 g	4.5 g
Folch 1-Fraktion	0.01 g	0.3 g
Diphosphoinositidfraktion (vor Säulenreinigung)	1 mg	20 mg
Diphosphoinositidfraktion (nach Säulenreinigung)	-	5 mg

Der DPI-K der Lunge befindet sich nach der Verteilung über 15 Schütteltrichterstufen in Analogie zu dem DPI-K des Gehirns in der Unterphase 15. Dieses typische Verhalten in der Löslichkeit bei der multiplikativen Verteilung kann mit zur Identifizierung der Substanz herangezogen werden. Ferner verliefen alle für den DPI-K kennzeichnenden Reaktionen auf dem Papierchromatogramm positiv. Inosit konnte als Bestandteil beider Komponenten nachgewiesen werden. Eine Hydrolyse der isolierten Substanz bei 100° mit 5 n Salzsäure ergab bei papierchromatographischer Prüfung der Spaltprodukte nach DESJOBERT und PETEK¹³⁰⁾ eine phosphathaltige Substanz, die nach dem R_F -Wert 0.30 auf ein Inositdiphosphat schließen ließ. Als weitere Hydrolyseprodukte fanden wir durch papierchromatographische Analyse ein Fettsäuregemisch der gleichen qualitativen Zusammensetzung, wie bei dem DPI-K des Rinderhirns: Stearinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure. Glyzerin konnte nach der auf Seite 90 beschriebenen Methode nachgewiesen werden.

¹³⁰⁾ A.DESJOBERT u. F.PETEK, Bull.soc.chim.biol. 38, 871 (1956)

Auch der DPI-K von Leber und Herzmuskel konnte durch das neue Isolierungsverfahren angereichert werden. Ein erheblicher Anteil nicht entfernbare Verunreinigungen verhinderte jedoch eine Isolierung der reinen Substanz.

Damit konnte der Nachweis erbracht werden, daß der DPI-K nicht nur im Gehirn, sondern auch in anderen Organen vorkommt. Der Grund, weshalb die Substanz bisher außerhalb des Gehirns nicht gefunden wurde, dürfte vor allem auf 3 Faktoren zurückzuführen sein:

- a) Wie schon erwähnt, kommt der DPI-K in den untersuchten Organen nur in sehr geringen Konzentrationen vor.
- b) Es fehlten brauchbare Nachweismethoden für derartig geringe Substanzmengen.
- c) Vermutlich unterliegt der DPI-K dieser Organe einem raschen Abbau durch Fermente, nachdem im G e h i r n derartige den DPI-K angreifende Enzyme vorliegen, wie seit den Arbeiten von SLOANE-STANLEY¹³¹⁾ und RODNIGHT¹³²⁾ bekannt ist. Im Rahmen neuerer Untersuchungen berichten THOMPSON und DAWSON¹³³⁾ über zwei Enzymsysteme des Gehirns, welche den DPI-K an der Bindung Inosit-Phosphat bzw. an der Bindung Glycerin-Phosphat aufspalten. Eigene Beobachtungen weisen darauf hin, daß in den anderen Organen, insbesondere in der Lunge, ebenfalls Enzymsysteme vorhanden sind, durch deren Einwirkung der DPI-K abgebaut wird. Nur bei sofortigem Einfrieren der Lungen frischgeschlachteter Tiere und anschließender Gefriertrocknung gelang es uns, den DPI-K zu isolieren. Wie unsere Versuche zeigten, ist eine Gewinnung des DPI-K aus Lungengewebe, das zunächst ca. 10 Stunden bei 15° gelagert wurde, nicht mehr möglich.

131) G.H.SLOANE-STANLEY, Biochem.J. 53, 613 (1953)

132) R.RODNIGHT, Biochem.J. 63, 223 (1955)

133) W.THOMPSON u. R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 83, 5P (1962)

C. In vivo-Einbau von ^{32}P in den Diphosphoinositidkomplex der Rattenorgane Gehirn, Niere, Lunge, Herzmuskel, Milz und Leber

I. Bisherige Arbeiten über den Stoffwechsel der Inositphosphatide

Inosithaltige Phosphatide tierischer Organe zeigen beim ^{32}P -Einbau in vitro und in vivo zumeist eine höhere Markierung als die übrigen Phosphatide. Daher wurde gerade dem Stoffwechsel dieser Phosphatidklasse besonderes Augenmerk geschenkt.

Die Anregung zu diesen Arbeiten gab DAWSON¹³⁴⁾¹³⁵⁾. Als er in vitro den Einbau von ^{32}P in die Phosphatide des Meerschweinchenhirns untersuchte, fand er, daß "Diphosphoinositid" am höchsten markiert wurde. Einbaustudien von HOKIN und HOKIN¹³⁶⁾ sowie von McMURRAY und Mitarbeitern¹³⁷⁾ bestätigten die physiologische Sonderstellung des "Diphosphoinositids", das damals noch als einheitliche und außerdem als die einzige inosithaltige Substanz des Gehirns betrachtet wurde. In Anlehnung an diese Ergebnisse untersuchten MAGEE und Mitarbeiter¹³⁸⁾, ANSELL und MORGAN¹³⁹⁾ sowie ANSELL und DOHMEN¹⁴⁰⁾ den Einfluß verschiedener Arzneimittel auf die ^{32}P -Einbaugeschwindigkeit in das "Hirndiphosphoinositid".

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten fanden HOKIN und HOKIN¹⁴¹⁾ bei späteren Untersuchungen eine verschwindend kleine Einbaurate des "Diphosphoinositids", während für das erstmalig auf seinen ^{32}P -Einbau untersuchte Monophosphoinositid des Gehirns eine hohe Markierung gemessen wurde. Dieser Widerspruch blieb längere Zeit ungeklärt, da geeignete chromatographische Verfahren zur Auftrennung des Mono- und Diphosphoinositids fehlten. Eben-

-
- 134) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 57, 237 (1954)
135) R.M.C.DAWSON, Biochim.biophysica Acta 14, 374 (1954)
136) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, Biochim.biophysica Acta 18, 102 (1955)
137) W.L.McMURRAY, K.P.STRICKLAND, J.F.BERRY u. R.J.ROSSITER, Biochem.J. 66, 634 (1957)
138) W.L.MAGEE, J.F.BERRY u. R.J.ROSSITER, Biochim.biophysica Acta 21, 408 (1956)
139) G.B.ANSELL u. A.MORGAN, Biochem.J. 69, 30 P (1958)
140) G.B.Ansell u. H.DOHMEN, J.Neurochem. 2, 1 (1957)
141) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 818 (1958)

so blieb die Frage nach dem Phosphatstoffwechsel der einzelnen Komponenten des DPI-K unbeantwortet. Erst WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹⁴²⁾¹⁴³⁾ konnten mit Hilfe einer neuen Methode erstmalig den in vivo-Einbau von ^{32}P in das Monophosphoinositid und die beiden Diphosphoinositide des Rattenhirns messen. Die spezifischen Aktivitäten dieser drei Verbindungen wurden gegeneinander abgegrenzt. Alle Inositphosphatide des Gehirns wurden hoch markiert und zwar wesentlich höher, als die anderen Phosphatide. Der wichtigste Befund aber war der, daß der DPI-K aktiver als das Monophosphoinositid einbaute.

Eine Bestätigung der Arbeiten¹⁴²⁾¹⁴³⁾ ergab sich aus neueren Untersuchungen von BROCKERHOFF und BALLOU¹⁴⁴⁾. Dabei wurden die Inositphosphatide von Kaninchenhirn in vitro mit ^{32}P -Phosphat markiert und die Desacylierungsprodukte auf ihre spezifische Aktivität untersucht. Die Einbaurate nahm von Monophosphoinositid über Diphosphoinositid zum Triphosphoinositid zu. Daher wurde eine direkte Phosphorylierung der Inositphosphatide in der angegebenen Reihenfolge angenommen. Durch Einbauversuche mit ^{14}C -Glyzerin und ^2H -Inosit konnten BROCKERHOFF und BALLOU¹⁴⁵⁾ bestätigen, daß die Inositphosphatide stufenweise phosphoryliert werden. Darüberhinaus vermuten diese Autoren, daß die Inositphosphatide ein reversibles Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungssystem darstellen, dessen biochemische Rolle evtl. im Kationentransport zu suchen ist. ELLIS und HAWTHORNE¹⁴⁶⁾ führten kürzlich analoge ^{32}P -Einbaustudien in vivo durch und fanden auf Grund dieser Versuche eine stufenweise Phosphorylierung des Monophosphoinositids. Auch sie vermuten, daß die Inositphosphatide eine Funktion im Kationentransport des Nervengewebes erfüllen.

142) H. WAGNER, Ä. LISSAU, J. HÖLZL u. L. HÖRHAMMER, Biochem. Z. 335, 312 (1961)

143) H. WAGNER, Ä. LISSAU, J. HÖLZL u. L. HÖRHAMMER, J. Lipid Research 3, 177 (1962)

144) H. BROCKERHOFF u. C. E. BALLOU, J. biol. Chemistry 237, 49 (1962)

145) H. BROCKERHOFF u. C. E. BALLOU, J. biol. Chemistry 237, 1764 (1962)

146) R. B. ELLIS u. J. N. HAWTHORNE, Biochem. J. 84, 19 P (1962)

Aus diesen Untersuchungen läßt sich ableiten, daß der DPI-K des Gehirns zusammen mit dem Monophosphoinositid eine Schlüsselstellung im Phosphatstoffwechsel dieses Organs einnimmt. In Niere, Lunge, Herzmuskel, Milz und Leber kommt der DPI-K in geringeren Konzentrationen als im Gehirn vor und außerdem unterscheiden sich diese Organe vom Gehirn in physiologischer Hinsicht. Daher war es von besonderem Interesse, den Phosphatstoffwechsel des DPI-K auch in diesen Organen zu studieren. In diesem Zusammenhang war auch der Vergleich zum ^{32}P -Einbau der anderen Phosphatide, insbesondere des Monophosphoinositids, von Bedeutung. Während der DPI-K dieser Organe bisher noch nicht untersucht wurde, liegen eine Reihe von Arbeiten über das Verhalten des Monophosphoinositids verschiedener Organe vor. Sowohl DAWSON¹⁴⁷⁾ als auch MARINETTI und Mitarbeiter¹⁴⁸⁾ hatten den Einbau in das Monophosphoinositid der Rattenleber studiert. FREINKEL¹⁴⁹⁾ fand, daß das Monophosphoinositid von Schilddrüsen hoch markiert wurde, während HOKIN und Mitarbeiter das Monophosphoinositid der Bauchspeicheldrüse¹⁵⁰⁾, der Hypophyse¹⁵¹⁾ und des Nebennierenmarks¹⁵²⁾ auf seinen ^{32}P -Stoffwechsel geprüft hatten. Auch MOSCATELLI und LARNER¹⁵³⁾ gingen beim Einbau des ^{14}C -Inosits in die Inositphosphatide des Herzmuskels, der Leber und Niere von der Voraussetzung aus, daß Monophosphoinositid das einzige inosithaltige Phosphatid dieser Organe darstelle. In diesen Arbeiten konnte meist eine hohe Markierung des Monophosphoinositids festgestellt werden.

147) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 61, 552 (1955)

148) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Biochim. biophysica Acta 25, 585 (1957)

149) N.FREINKEL, Biochem.J. 68, 327 (1958)

150) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 805 (1958)

151) M.R.HOKIN, L.E.HOKIN, M.SAFFRAN, A.V.SCHALLY u. B.U.ZIMMERMANN, J.biol.Chemistry 233, 811 (1958)

152) M.R.HOKIN, G.B.BENFEY u. L.E.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 814 (1958)

153) E.A.MOSCATELLI u. J.LARNER, Arch.Biochem.Biophys. 80, 26 (1959)

II. Eigene Untersuchungen

Die Methodik der folgenden Untersuchungen beruht zum Großteil auf den Verfahren von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹⁵⁴⁾ und LISSAU¹⁵⁵⁾.

Der Einbau von ^{32}P in die Phosphatide erfolgte in vivo. Dazu wurde den Versuchstieren eine wässrige Lösung von $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ subcutan gespritzt. Die Tiere wurden 4, 8 und 32 Stunden nach der Injektion getötet und aus den gefriergetrockneten und mit Aceton vor-extrahierten Organen durch Ätherextraktion die Phosphatide gewonnen.

Die folgende Tabelle 11 enthält die Gewichte der untersuchten Organe vor und nach der Gefriertrocknung, sowie die Ausbeuten der Ätherextraktionen. Die Angabe 'Ätherextrakt in %' bezieht sich auf die Organtrockengewichte.

T a b e l l e 11

Ergebnisse von Gefriertrocknung und Extraktion der Rattenorgane

Organe einer Ratte von 180 g	Organfrischgewicht in g	Organtrockengewicht in g	Wassergehalt %	Ätherextrakt mg	Ätherextrakt %
Gehirn	1.65	0.32	80.6	88.0	27.5
Nieren	1.8	0.4	77.8	18.8	4.6
Lunge	1.17	0.23	80.3	19.1	8.3
Herzmuskel	1.05	0.21	80.0	12.25	5.9
Milz	0.92	0.21	77.3	7.5	3.5
Leber	7.2	1.84	74.5	111.0	6.1

Sämtliche Organe zeigten einen weitgehend gleichen Wassergehalt von ca. 75 - 80%. Auch die Ausbeuten an Phosphatiden bei der Ätherextraktion sind ziemlich ähnlich. Eine Ausnahme bildet das besonders phosphatidreiche Gehirn mit 27.5% Ätherextrakt. Die

154) H.WAGNER, Ä.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, J.Lipid Research 3, 177 (1962)

155) Ä.LISSAU, Dissertation München(1960)

geringste Ausbeute erhielten wir aus der Milz mit 3.5%, während sich die Lunge mit 8.3% nach dem Gehirn als das phosphatidreichste Organ erwies.

Die Auftrennung der in den Ätherextrakten befindlichen Phosphatide erfolgte in Analogie zum Verfahren von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER durch absteigende Papierchromatographie. In Abweichung von dieser Methode färbten wir die Chromatogramme zunächst durch Bedampfen mit Osmiumtetroxyd an, da hierbei anorganisches Phosphat im Gegensatz zur Anfärbung mit Nilblaulösung nicht aus dem Chromatogramm eluiert wird. Die spezifische Aktivität dieser Substanz war als Bezugswert für die folgenden Bestimmungen unbedingt erforderlich.

Die Lokalisierung des nur in geringen Konzentrationen vorkommenden DPI-K erfolgte durch Autoradiographie. Dabei wurde die Expositionszeit so gewählt, daß etwa 1 Million Impulse auf den Röntgenfilm gelangten. In unserem Fall waren dafür ca. 5 Tage erforderlich.

Die folgende Abb. 6a zeigt die Chromatogramme der Ätherextrakte aus den untersuchten Organen, wobei die Anfärbung aus Reproduktionsgründen mit Nilblaulösung erfolgte. Abb. 6b stellt das entsprechende Autoradiogramm dar. Die Phosphatide der Flecken 2, 4, 5, 6 und 7 wurden durch Vergleich mit den entsprechenden Reinsubstanzen identifiziert:

Fleck 1 ($R_F = 0.87$) entspricht dem Cardiolipin, das nur auf dem Autoradiogramm der Leber (Abb. 6b) deutlich in Erscheinung tritt.

Fleck 2 ($R_F = 0.78$) ist einem Gemisch aus Phosphatidyläthanolamin und Lecithin zuzuordnen, welches durch das angewandte chromatographische Verfahren nicht aufzutrennen ist.

Fleck 3 ($R_F = 0.68$) dürfte mit der Phosphatidsäure¹⁵⁶⁾ identisch sein. Diese tritt sowohl auf dem Chromatogramm als auch auf dem Autoradiogramm als Bestandteil der Lungenphosphatide besonders stark in Erscheinung.

Fleck 4 ($R_F = 0.61$) entspricht dem Phosphatidylserin.

156) R. DIETZEL, Dissertation München (in Vorbereitung)

Fleck 5 ($R_f = 0.5$) wurde als Monophosphoinositid identifiziert.

Fleck 6 ($R_f = 0.37$) stimmt mit dem Diphosphoinositid 1 des Rinderhirns überein. Da es in den Extrakten in relativ geringer Konzentration vorkommt, reichte die Empfindlichkeit der Nilblaulösung bei der aufgetragenen Substanzmenge nicht aus. Dagegen war die autoradiographische Methode empfindlich genug, um Diphosphoinositid 1 nachzuweisen.

Fleck 7 ($R_f = 0.3$) ist mit dem Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid) des Rinderhirns identisch. Während Diphosphoinositid 1 auf den Autoradiogrammen *a l l e r* untersuchten Organe nachgewiesen wurde, fanden wir Diphosphoinositid 2 nur bei Gehirn, Lunge, Leber und Herzmuskel, nicht dagegen bei Niere und Milz.

Fleck 8 ($R_f = 0.16$) und die darunterliegenden Flecken stellen gut wasserlösliche Substanzen dar, wobei es sich bei Fleck 8 um anorganisches Phosphat handelt.



Abb. 6a

Papierchromatogramm der
Ätherextrakte von Gehirn(a),
Niere(b), Herzmuskel(c),
Lunge(d), Milz(e), Leber(f)
Fließmittel: B/E/W (4:1:5)
absteigend (37 cm) auf
Formaldehydpapier
Anfärbemittel:
Nilblaulösung



Abb. 6b

Autoradiogramm der nach
4stündigem ^{32}P -Einbau her-
gestellten Ätherextrakte
von Gehirn(a), Niere(b),
Herzmuskel(c), Lunge(d),
Milz(e), Leber(f)
PERUTZ PER-X-Film
Expositionszeit: 5 Tage
F = Neutralfette und
Fettsäuren
1 = Cardiolipin
2 = Phosphatidyläthanolamin
und Lecithin
3 = Phosphatidsäure
4 = Phosphatidylserin
5 = Monophosphoinositid
6 = Diphosphoinositid 1
7 = Diphosphoinositid 2
(Triphosphoinositid)
8 = anorganisches Phosphat

Die aufgetrennten und lokalisierten Phosphatidflecken wurden nun auf ihre Radioaktivität und ihren Phosphorgehalt untersucht und daraus die spezifische Aktivität berechnet.

Wie bereits früher beschrieben¹⁵⁷⁾ wurde die Radioaktivität als *r e l a t i v e* Aktivität mittels Strahlungsmeßgerät bestimmt. Eine quantitative Auswertung der Autoradiogramme zur indirekten Messung der Radioaktivität erfolgte jedoch im Gegensatz zu diesen Autoren nicht, da das Strahlungsmeßgerät genauer arbeitet, besonders, wenn es sich um höher markierte Substanzen handelt, als sie im Gehirn vorliegen.

Bei der Messung der Radioaktivität galt es, eine Reihe von Fehlerquellen auszuschalten, um brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

So tritt durch die *T o t z e i t* des Meßkopfes ein Fehler auf, wenn die Anzahl der pro Zeiteinheit empfangenen Impulse zu hohe Werte erreicht. Im Falle des Gemisches Kephalin/Lecithin, dessen Chromatogrammflächen über 30000 Imp./Min. lieferten, mußte aus der Totzeit ein erheblicher Fehler resultieren. Zur Verringerung der Impulszahl wurden in diesen seltenen Fällen nur Teilstücke der Phosphatidflecken ausgewertet. Bei den Untersuchungen von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER spielte dieses Problem infolge der niedrigeren Einbauraten des Gehirns keine Rolle.

Während die Korrektur der erhaltenen Meßwerte durch den Faktor der theoretischen ³²P-Zerfallsreihe auch von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER durchgeführt wurde, führten wir als zusätzlichen Korrekturfaktor den reziproken Wert der experimentell ermittelten Wirkungsgrade ein. Dadurch wird der "*P a p i e r - f e h l e r*" ausgeglichen.

Anschließend bestimmten wir den Phosphorgehalt der Chromatogrammflächen¹⁵⁷⁾, um die spezifische Aktivität zu erhalten.

157) H. WAGNER, A. LISSAU, J. HÖLZL u. L. HÖRHAMMER, J. Lipid Research 3, 177 (1962)

1. Ergebnisse des ^{32}P -Einbaus

Um zu prüfen, wie sich die Gesamtphosphatide der einzelnen Organe in ihrem Einbau verhalten, wurden zunächst die Ätherextrakte auf ihre spezifische Aktivität untersucht und das Ergebnis in Tabelle 12 zusammengefaßt. Dazu trugen wir aliquote Extraktanteile gleichmäßig auf Formaldehydpapierscheibchen auf, um die gleichen Meßbedingungen wie bei der Bestimmung der einzelnen Phosphatide zu erzielen.

T a b e l l e 12

Spezifische Aktivität der Ätherextrakte nach 4, 8 und 32 Stunden

Einbauzeit in Stunden	Spezifische Aktivität (c p m/ μg P) untersuchtes Organ:					
	Gehirn	Niere	Lunge	Herzmuskel	Milz	Leber
4	415	7540	11810	3470	5620	17840
8	475	8300	11930	3930	6120	19910
32	890	8820	11760	4220	6630	12510

Für den DPI-K liefert Tabelle 12 keine weiteren Aussagen. Es geht jedoch aus den Werten klar hervor, daß die spezifische Aktivität des Gehirns um ein vielfaches unter der Einbaurate anderer Organe liegt. Die höchste Aktivität erreichte der Leberextrakt nach 8 Stunden Einbauzeit mit dem Wert von 19910. Eine gleichfalls hohe Markierung zeigte die Lunge mit einer ziemlich gleichbleibenden spezifischen Aktivität von ca. 11000 bei den 3 Einbauzeiten. Während Niere und Milz mittlere Einbauraten aufwiesen, lieferte der Herzmuskel Werte zwischen ca. 3000 und 4000.

Die folgende Tabelle 13 enthält die spezifische Aktivität der Phosphatide und des anorganischen Phosphats nach 4, 8 und 32 Stunden Einbauzeit.

T a b e l l e 13

Spezifische Aktivität der einzelnen Phosphatide nach 4, 8 und 32 Stunden

Substanz	Einbau- zeit in Stunden	Spezifische Aktivität (c p m / μ g P) untersuchtes Organ					
		Gehirn	Niere	Lunge	Herzmuskel	Milz	Leber
Lecithin und Phosphatidylcholanolemin	4	78	7300	10250	1220	3040	22300
	8	163	11160	10890	2100	7160	26580
	32	538	10170	10700	3830	8800	15000
Phosphatidylserin	4	-	930	825	421	494	1775
	8	-	2220	1395	1405	2580	7340
	32	163	6480	2355	3390	5070	11500
Monophosphoinositid	4	872	26400	22600	8150	15400	3900
	8	890	14460	19920	12440	13520	5030
	32	1440	11550	10600	13900	9650	6900
Diphosphoinositid 1 (Diphosphoinositid)	4	925	7310	31400	13290	15010	9350
	8	876	7360	20560	7520	10340	8000
	32	1123	7130	6850	5430	7120	7790

Fortsetzung siehe Seite 64

Fortsetzung von Tabelle 13:

Substanz	Einbau- zeit in Stunden	Spezifische Aktivität (c p m / μ g P) untersuchtes Organ					
		Gehirn	Niere	Lunge	Herzmuskel	Milz	Leber
Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)	4	1083	-	16650	11500	-	7110
	8	1360	-	14300	6800	-	6850
	32	1435	-	6020	5180	-	8820
Anorganisches Phos- phat	4	3430	32000	36600	55000	37200	50500
	8	2340	25400	23200	29000	25000	26500
	32	2110	12200	8790	8510	10650	13400

Die folgenden Abbildungen 7a - 7f enthalten die in Tabelle 13 angegebenen spezifischen Aktivitäten der einzelnen Phosphatide jedes Organs in graphischer Darstellung.

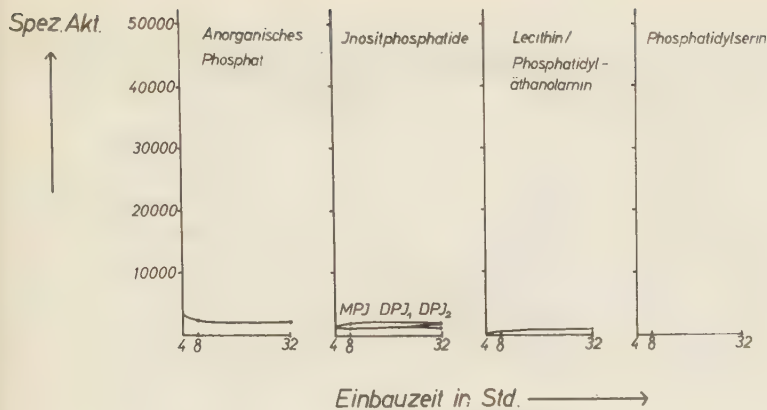


Abb. 7a

Spezifische Aktivität der G e h i r n phosphatide nach 4,8 u.32 Std.
Einbauzeit

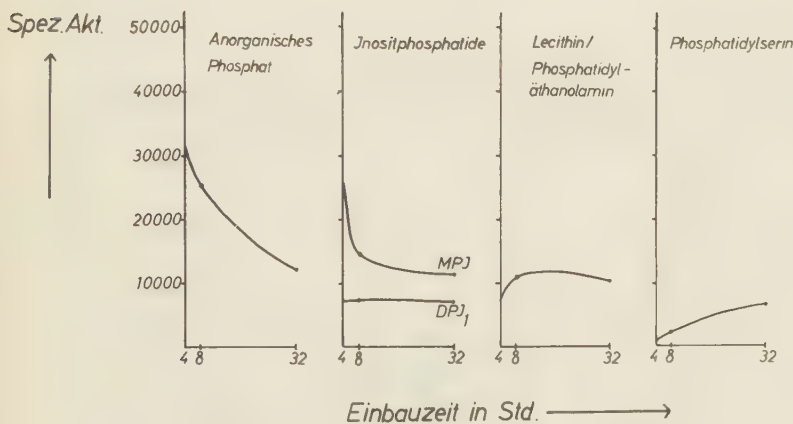


Abb. 7 b

Spezifische Aktivität der N I E R E N phosphatide nach 4,8 u.32 Std.
Einbauzeit

Abkürzungen: MPI = Monophosphoinositid
DPI 1= Diphosphoinositid 1
DPI 2= Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)

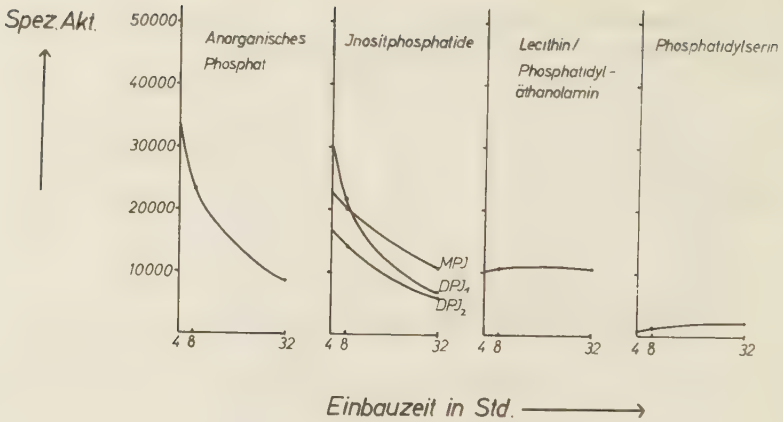


Abb. 7c

Spezifische Aktivität der Lungenphosphatide nach 4, 8 u. 32 Std. Einbauzeit

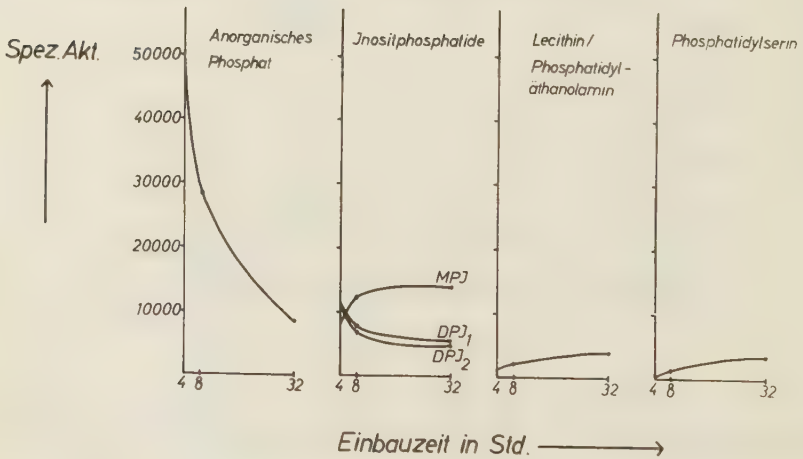


Abb. 7d

Spezifische Aktivität der Herzmuskelphosphatide nach 4, 8 und 32 Std. Einbauzeit

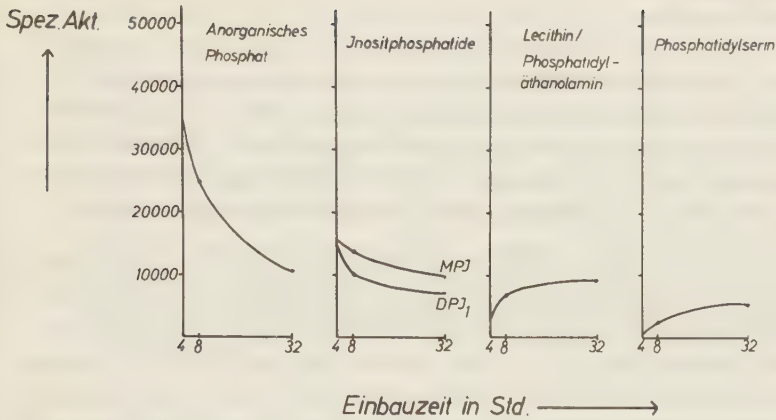


Abb. 7e

Spezifische Aktivität der M i l c h phosphatide nach 4, 8 u. 32 Std.
Einbauzeit

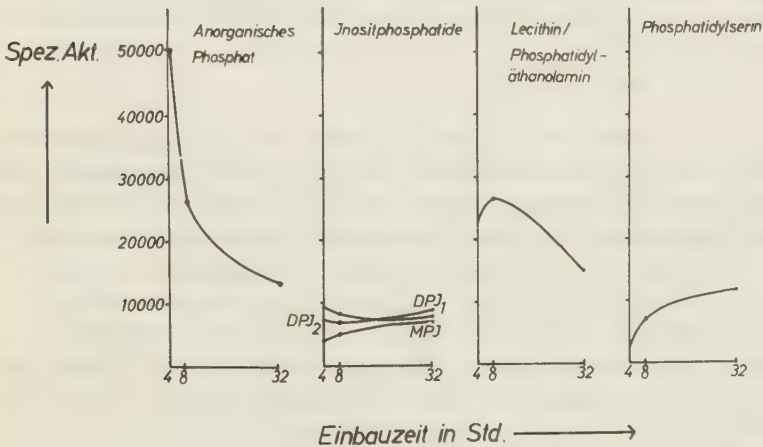


Abb. 7f

Spezifische Aktivität der L e b e r phosphatide nach 4, 8 u. 32 Std.
Einbauzeit

2. Diskussion

Wie aus den Abbildungen 7a - 7f zu entnehmen ist, verfügen fast alle Inosithosphatide der untersuchten Organe mit Ausnahme von Leber und Gehirn nach 4 und 8 Stunden Einbauzeit über die höchste spezifische Aktivität. Dabei übertreffen die Einbauraten des Monophosphoinositids oftmals die des DPI-K. In den einzelnen Organen waren die Verhältnisse folgende:

G e h i r n (Abb. 7a): Die Inosithosphatide dieses Organs zeigten in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen¹⁵⁸⁾ eine Zunahme der spezifischen Aktivität zwischen 4 und 32 Stunden Einbauzeit. Sie stellen die weitaus höchstmarkierten Phosphatide dieses Organs dar. Dabei übertrafen die spezifischen Aktivitäten von Diphosphoinositid 1 und Diphosphoinositid 2 nach 4 Stunden die Einbaurate des Monophosphoinositids. Lecithin/Phosphatidyläthanolamin erreichten nach 32 Stunden den Höchstwert von 538. Wie in fast allen anderen untersuchten Organen zeigt das Phosphatidylserin auch im Gehirn den niedrigsten Einbau (163). Das anorganische Phosphat dagegen stellte wie in den anderen Organen die höchstmarkierte Substanz dar und besaß eine größte spezifische Aktivität von 3430 schon nach 4 Stunden.

N i e r e (Abb. 7b): In diesem Organ war das Monophosphoinositid nach 4, 8 und 32 Stunden höher markiert, als das Diphosphoinositid 1 und erwies sich als das Phosphatid mit der höchsten Einbaurate. Die spezifischen Aktivitäten der N-Phosphatide nahmen fast durchweg mit längerer Einbauzeit zu. Sie stimmten ungefähr mit den Einbauraten der entsprechenden Milzphosphatide (Abb. 7e) überein. Anorganisches Phosphat hatte nach 4 Stunden einen Wert von 32000, der sich beim Versuch über 32 Stunden auf ca. 1/3 erniedrigte und mit den Ergebnissen bei der Milz vergleichbar ist.

¹⁵⁸⁾ H.WAGNER, A.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, Biochem.Z. 335, 312 (1961)

L u n g e (Abb. 7c): Hier konnte bei allen Inositphosphatiden ein rascher und sehr hoher Einbau festgestellt werden. Dabei erreichte das Diphosphoinositid 1 mit einem Wert von 31400 schon nach 4 Stunden die höchste Markierung aller untersuchten Phosphatide. Allerdings betrug die spezifische Aktivität dieser Substanz nach 32 Stunden nur noch 6850, was einer Abnahme um ca. 80% gleichkommt. Dagegen traten das Gemisch Lecithin/Phosphatidyläthanolamin mit der gleichbleibenden Einbaurrate von ca. 10000, sowie das relativ niedrig markierte Phosphatidylserin hier wenig hervor. Auch anorganisches Phosphat fällt mit einem Wert von 36600 nach 4 Stunden nicht sonderlich auf.

H e r z m u s k e l (Abb. 7d): Die drei Inositphosphatide stellen auch in diesem Organ die weitaus höchstmarkierten Phosphatide dar. Alle erreichten eine spezifische Aktivität von über 10000. Im Vergleich dazu waren die Einbauraten von Lecithin/Phosphatidyläthanolamin mit maximal 3830 und Phosphatidyläthanolamin mit dem Höchstwert 3390 sehr gering. Dagegen wurde in diesem Organ für anorganisches Phosphat mit dem Wert 55000 die absolut höchste spezifische Aktivität aller untersuchten Substanzen gefunden.

M i l z (Abb. 7e): Die spezifischen Aktivitäten der beiden Inositphosphatide übertrafen auch hier die Werte der übrigen Phosphatide und verhielten sich ziemlich ähnlich. Die N-Phosphatide dieses Organs und das anorganische Phosphat zeigten in ihrer Einbaurrate eine teilweise Übereinstimmung mit den entsprechenden Substanzen der Niere.

L e b e r (Abb. 7f): In diesem Organ erreichten die Inositphosphatide in keinem Fall die spezifische Aktivität von 40000 und blieben damit, wenn man vom Gehirn absieht, wesentlich unter den Einbauraten der anderen Organe. Dagegen wurde das Gemisch Lecithin/Phosphatidyläthanolamin erheblich stärker markiert, als in allen übrigen Organen. Es lieferte nach 4, 8 und 32 Stunden auffallend hohe Werte (22300, 26580 und 15000). Sogar die Einbaurrate des Phosphatidylserins übertraf

mit 11500 nach 32 Stunden die entsprechenden Werte der Inositphosphatide. Auch anorganisches Phosphat war sehr hoch markiert. Seine höchste spezifische Aktivität betrug 50500.

Aus diesen Untersuchungen geht klar hervor, daß alle untersuchten Organe mit Ausnahme der Leber hinsichtlich des Phosphatstoffwechsels ihrer Inositphosphatide eine Sonderstellung einnehmen, die sich in einer hohen Markierung äußert.

Die größte Einheitlichkeit in der Ab- und Zunahme der spezifischen Aktivität mit zunehmender Einbauzeit war jedoch beim anorganischen Phosphat und Phosphatidylserin zu beobachten. Das Phosphatidylserin wurde in jedem Organ mit zunehmender Einbauzeit stärker markiert und zeigte jedesmal die höchste spezifische Aktivität erst nach 32 Stunden. Dagegen nahm die spezifische Aktivität des anorganischen Phosphats in allen Organen von 4 - 32 Stunden ab. Dabei fällt auf, daß die rasche und hohe Markierung des anorganischen Phosphats sowie der Aktivitätsschwund bei langer Einbauzeit in der Mehrzahl der Fälle auch für den DPI-K zutrifft. Somit ist eine gewisse Analogie im Verhalten dieser Substanzen unverkennbar.

Sonderfälle unter den untersuchten Organen hinsichtlich ihres Phosphateinbaus stellen das Gehirn und die Leber dar.

Alle Substanzen des Gehirns wurden etwa 5 - 25mal weniger markiert, als die Substanzen der übrigen Organe. Diese erstaunlich niedrigen Einbauraten des Gehirns lassen sich vermutlich auf die Existenz einer "Blut-Hirn-Barriere"¹⁵⁹⁾¹⁶⁰⁾ zurückführen. Diese Schranke hält Ionen weitgehend zurück, also auch anorganisches markiertes Phosphat, das somit als sog. Schrankenindikator gilt. Dadurch wird die niedrige spezifische Aktivität des anorganischen Phosphats und wohl auch der Gehirnphosphatide erklärt. Da jedoch das Markierungsniveau aller Gehirnssubstanzen tiefer liegt, ist ein Vergleich

¹⁵⁹⁾ P.J.HEALD, Phosphorus Metabolism of Brain, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, p. 15 (1960)

¹⁶⁰⁾ G.QUADBECK, Münchener med.Wschr. 1, 24 (1962)

mit den Phosphatiden anderer Organe, die eine solche Schranke nicht besitzen, durchaus sinnvoll und zeigt in mehrfacher Hinsicht, vor allem im hohen Einbau der Inositphosphatide, eine gute Übereinstimmung. Doch ist die Einbaugeschwindigkeit der Inositphosphatide des Gehirns im Gegensatz zur Mehrzahl der Fälle gering. Während die drei Gehirninositide erst nach 32 Stunden die höchste spezifische Aktivität erreichen, zeigen die Inositphosphatide der meisten anderen Organe, insbesondere der DPI-K, einen raschen Einbau und ihre maximale Einbaurate bereits nach 4 Stunden. Dadurch liegt die spezifische Aktivität vom DPI-K des Gehirns nach 4 Stunden noch weit unter dem Markierungsniveau des DPI-K anderer Organe, während nach 32stündigem Einbau eine Annäherung der Werte stattfindet. Das Gehirndiphosphoinositid 1 besitzt demzufolge nach 4 Stunden Einbauzeit rd. 3% - 13% der spezifischen Aktivität des Diphosphoinositids 1 der übrigen Organe. Nach 32 Stunden steigt dieser Anteil des Gehirns jedoch auf 15% - 21%. Ähnlich sind die Verhältnisse beim Diphosphoinositid 2. Nach 4 Stunden beträgt die Einbaurate der Gehirnssubstanz 6% - 15% des Diphosphoinositids 2 von Lunge, Herzmuskel und Leber. Nach 32 Stunden hat das Gehirndiphosphoinositid 2 erheblich aufgeholt und seinen Anteil an spezifischer Aktivität auf einen Betrag von 16% - 28% erhöht.

Einen weiteren Ausnahmefall stellt die Leber dar.

Hier übertrafen die spezifischen Aktivitäten sämtlicher stickstoffhaltigen Phosphatide, insbesondere die von Lecithin/Phosphatidyläthanolamin, die Markierung der Inositphosphatide beträchtlich. In keinem anderen Organ erreichten die stickstoffhaltigen Phosphatide annähernd so hohe spezifische Aktivitäten wie in der Leber. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen hatte DAWSON¹⁶¹⁾ beim Einbau in die intakte Rattenleber die höchsten spezifischen Aktivitäten bei Phosphatidyläthanolamin und Lecithin festgestellt, während Monophosphoinositid niedriger markiert war. Der DPI-K wurde dabei nicht untersucht. Dieser ausgeprägte Phosphatstoffwechsel der N-Phosphatide deutet darauf hin, daß die Leber eine Hauptproduktionsstätte der stickstoffhaltigen Phosphatide ist.

161) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 61, 552 (1955)

Für die Inositphosphatide und insbesondere für den DPI-K läßt sich auf Grund unserer Versuche gegenüber den N-Phosphatiden ein deutlicher Unterschied im Phosphatstoffwechsel feststellen, der vor allem aus der Höhe, jedoch teilweise auch aus der Geschwindigkeit des Umsatzes hervorgeht. Daher liegt die Vermutung nahe, daß der Biosyntheseweg der Inositphosphatide abweichend von dem der stickstoffhaltigen Phosphatide verläuft.

Der von uns gemessene hohe Phosphatstoffwechsel der Inositphosphatide läßt den Schluß zu, daß die untersuchten Organe, abgesehen von der Leber, für die Synthese dieser Phosphatidklasse autonom sind.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Gewinnung des Diphosphoinositidkomplexes des Rinderhirns

Als Ausgangsmaterial dienten 35 Rinderhirne von 16 kg Gewicht. Wir erhielten die Organe sofort nach dem Schlachten der Tiere im Schlachthof.

Durch 3stündiges Einfrieren im Kühlraum bei -20° erhielten die Gehirne eine feste Konsistenz und konnten in diesem Zustand gut von Häuten und geronnenem Blut befreit werden. Der Abfall betrug 1000 g.

Wir zerschnitten anschließend die gefrorenen Gehirne in $1/2$ - 1 cm breite Scheiben, breiteten sie in dünner Schicht in Blechwannen (30 x 50 cm Bodenfläche) aus und lyophilisierten jeweils 7.5 kg Substanz. Bei einer Beheizung der Anlage auf 5°C war eine Trocknung des Gewebes innerhalb von 36 Stunden zu erzielen.

Das Zerkleinern der lyophilisierten Gehirne (3830 g) erfolgte im Fleischwolf.

I. Acetonextraktion

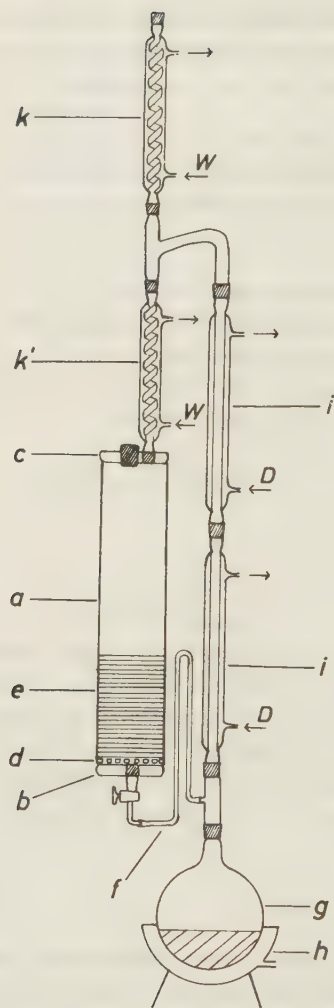
Dazu wurde das Trockenpulver mit 6 l Aceton versetzt, unter Verwendung eines Rührwerkes $1/2$ Stunde mazeriert und anschließend das Aceton auf einer Nutsche gründlich abgesaugt. Nach 6maliger Durchführung dieser Vorextraktion waren die unerwünschten Begleitstoffe, wie Cholesterin, Neutralfette und Fettsäuren weitgehend entfernt. Die vorextrahierte Gehirnsubstanz wurde durch Absaugen im Vakuumtrockenschrank von anhaftendem Aceton befreit. Sie betrug 2900 g.

II. Ätherextraktion

Diese erfolgte in einer selbst konstruierten Ganzglasapparatur (Abb. 8), die zur kontinuierlichen Extraktion großer Mengen tierischen und pflanzlichen Materials geeignet ist.

Abb. 8

Schemabild der Extraktions-
anlage



Erklärungen:

- a = Glasröhre (100 x 20 cm),
an den Enden plangeschliffen
- b = plangeschliffene Bodenplatte mit Abflußöffnung
- c = plangeschliffene Deckplatte mit aufgesetzten Schlangenkühlern und einer Einfüllöffnung
- d = durchlöchernte Porzellanplatten
- e = Extraktionsgut
- f = PVC-Schlauch (0.5 cm Ø)
- g = Rundkolben (20 l) mit Extraktionsflüssigkeit
- h = Dampfbad
- i = Liebigkühler (78 cm Länge) mit Dampfbeheizung (D)
- k = Schlangenkühler (63 cm Länge) mit Wasserkühlung (W)
- k' = Schlangenkühler (55 cm Länge) mit Wasserkühlung (W)

Die Apparatur besteht aus einer zylindrischen Glasröhre von 100 cm Länge und 20 cm Durchmesser, deren Enden plangeschliffen sind. Die Röhre ist durch ebenfalls geschliffene 20 mm starke Glasplatten verschlossen. Die Bodenplatte besitzt einen eingeschliffenen Hahn mit Abflußöffnung, während die Deckplatte mehrere Schlifföffnungen zur Beschickung der Apparatur mit Extraktionsgut und zur Anbringung von Kühlern besitzt. Um die Abflußöffnung freizuhalten, legten wir zwei durchlöchernte Porzellanplatten, mit Filterpapier umwickelt, in die Extraktionsröhre ein und füllten darauf das Extraktionsgut. Die abfließende Extraktionsflüssigkeit wurde durch einen PVC-Schlauch (0.5 cm Durchmesser) bis zur Höhe des Extraktionsgutes und dann in einen beheizten 20 l-Rundkolben geleitet. Dadurch arbeitete die Apparatur nach dem Soxhletprinzip. Der Äther wird aus dem Rundkolben über zwei mit Dampf beheizte Liebigkühler abdestilliert, in zwei Schlangenkühlern kondensiert und fließt von dort in das Extraktionsgefäß zurück. Für die Extraktion der 2900 g Gehirnsubstanz waren 7 l Äther erforderlich. Die Reinigung des Äthers von Peroxyden und Wasser wurde durch Behandlung von 10 Teilen Äther mit einem Teil Aluminiumoxyd "Woelm" (basisch), Aktivitätsstufe I, erzielt¹⁶²⁾. Der getrocknete Ätherextrakt wog 435 g. Die extrahierte Gehirnsubstanz (2465 g) enthielt noch alkohollösliche Lipide, vor allem Sphingomyelin und Ganglioside und diente zur Isolierung dieser Substanzen¹⁶³⁾.

III. Ausfällung der Folch 1-Fraktion

Dazu wurden die 435 g Ätherextrakt in 8 Teilen Chloroform (3480 ml) gelöst und mit 9.1 Teilen absolutem Äthanol (3958 ml) versetzt. Der nach 24 Stunden bei 4°C anfallende ölige, farblos-gelbliche Niederschlag wog 60 g und enthielt nach papierchromatographischer Prüfung den DPI-K, Monophosphoinositid, Phosphatidylserin, Phosphatidyläthanolamin, wenig Ganglioside, anorganisches Phosphat und wenig Aminosäuren.

¹⁶²⁾ G. WOHLLEBEN, Ang.Ch. 67, 741 (1955)

¹⁶³⁾ H. WAGNER, Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 62, 1115 (1960)

IV. Isolierung des Diphosphoinositidkomplexes

1. Hochstufige Verteilung ohne vorherige Entfernung wasserlöslicher Bestandteile

Das verwendete Lösungsmittelsystem bestand aus 4730 ml Spezialbenzin (120° - 140°) und 3050 ml Methanol. Ober- und Unterphase wurden 1 Stunde gegeneinander abgesättigt. Das System reichte für eine Verteilung über 65 Stufen bei einem Phasenvolumen von 50 ml aus.

Wir füllten die Unterphasen in die vollautomatische Craig-Apparatur ein (160 Elemente) und beschickten die Elemente 1 - 6 zur nochmaligen gegenseitigen Absättigung mit leerer Oberphase. Aus Glas 3 entnahmen wir Ober- und Unterphase, lösten darin 5 g Folch 1-Fraktion, füllten die Substanzlösung wieder ein und verteilten bis Stufe 65. Die Wartezeit zwischen den einzelnen Verteilungsschritten betrug bis Stufe 8 infolge Emulsionsbildung $1/4$ Stunde, konnte aber ab Stufe 25 auf 2 Minuten reduziert werden. Im weiteren Verlauf der Verteilung traten besonders in den Stufen 30 - 60 äußerst stabile Emulsionen auf, die Wartezeiten bis zu 5 Stunden erfordert hätten. Wir zerstörten daher die Emulsionen durch Beheizen der Elemente mit strömendem Wasserdampf.

Der DPI-K war in den Stufen 53 - 65 angereichert und sammelte sich nach 12 Stunden als gallertige Zwischenschicht zwischen Ober- und Unterphase. Wir gewannen die gallertige Substanz, indem wir die Unterphasen entfernten und von den Oberphasen durch kurzes Zentrifugieren bei 3000 U/Min. abtrennten. Nach Absaugen des Lösungsmittels im Vakuum fiel die Substanz als gelbliches grobkörniges Pulver an. Sie war lediglich in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) (Oberphase) etwas löslich. Von den Verteilungsstufen 1 - 52 wurden jeweils 2 in 250 ml Stehkolben aufgefangen und die Lösungsmittel bei 35°C und 30 Torr über Calciumchlorid abdestilliert.

Zur papierchromatographischen Prüfung lösten wir die Stufen 53 - 65 in Butanol/Eisessig/Wasser, die Stufen 1 - 52 in Chloroform/Methanol (1:1) und chromatographierten aufsteigend. Danach faßten wir die Fraktionen in folgender Weise zusammen:

- Stufe 1 - 3 : Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Ganglioside
- Stufe 4 - 27 : Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und Monophosphoinositid
- Stufe 28 - 46 : Phosphatidylserin
- Stufe 47 - 60 : Phosphatidylserin (abnehmend), DPI-K (zunehmend)
- Stufe 61 - 65 : DPI-K (mit Phosphatidylserin in Spuren).

Aminosäuren und anorganisches Phosphat waren in allen Elementen vorhanden, wobei das Phosphat in den Stufen 53 - 65 am meisten angereichert war.

2. Hochstufige Craig-Verteilung nach Entfernung der wasserlöslichen Bestandteile

10 g Folch 1-Fraktion wurden nach SMITH¹⁶⁴⁾ an Zellulose chromatographiert. Dazu füllten wir Glassäulen von 35 cm Länge und 4.2 cm Durchmesser mit Zellulosepulver 123a der Firma Schleicher u. Schüll und beschickten die Säulen mit 2mal 5 g Substanz. Nach zwei Arbeitsgängen resultierte aus insgesamt 10 g Folch 1-Fraktion 5.4 g einer Substanz, die von Aminosäuren völlig und von anorganischem Phosphat weitgehend frei war.

5 g davon verteilten wir in dem gegeneinander abgesättigten Verteilungssystem aus 7286 ml Spezialbenzin (120°-140°) und 4702 ml Methanol in der vollautomatischen Craig-Apparatur über 100 Schritte. Im Gegensatz zur vorhergehenden Verteilung traten in den Stufen 78 - 100, in denen sich der DPI-K angereichert hatte, keine gallertigen Ausscheidungen ungelöster Substanz auf. Wir sammelten je zwei Verteilungsstufen in 250 ml Stehkolben, lösten die bei 35° und 30 Torr zur

164) R.H.SMITH, Biochem.J. 57, 130 (1954)

Trockne eingeengten Phosphatide in je 1 ml wassergesättigtem Chloroform, chromatographierten aufsteigend auf Formaldehydpapier und faßten die Fraktionen danach in folgender Weise zusammen:

- Stufe 1 - 5 : Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Ganglioside
Stufe 5 - 40 : Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und Monophosphoinositid
Stufe 41 - 77 : Phosphatidylserin
Stufe 78 - 93 : Phosphatidylserin mit DPI-K verunreinigt
Stufe 94 - 100 : DPI-K und Phosphatidylserin etwa zu gleichen Anteilen.

3. Chromatographische Auftrennung des Gemisches aus Diphosphoinositidkomplex und Phosphatidylserin an einer Formaldehydzellulosesäule

170 g Zellulosepulver 123a der Firma Schleicher u. Schüll imprägnierten wir nach einer neuen Vorschrift von HÖRHAMMER und Mitarbeitern¹⁶⁵⁾ zur Herstellung von Formaldehydpapier mit einer Lösung von Paraformaldehyd in einem organischen Lösungsmittel. Dazu wurde das Gemisch 3 Stunden am Rückflußkühler unter Verwendung eines Rührwerkes gekocht. Die Formaldehydzellulose wurde 10mal mit 10 l Leitungswasser und 1mal mit 5 l entmineralisiertem Wasser gewaschen und nach Absaugen auf einer Filternutsche bei 35° im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

24 g der Formaldehydzellulose rührten wir mit der Oberphase des Gemisches Butanol/Wasser (4:5) zur feinen Suspension an, schlämmten sie in ein 60 cm langes Säulenrohr von 1.65 cm Durchmesser ein und wuschen mit 100 ml des angegebenen Fließmittels durch. Dann lösten wir 25 mg des äußerst schwer trennbaren, aus DPI-K und Phosphatidylserin bestehenden Substanzgemisches aus der 2. multiplikativen Verteilung (Stufe 94 - 100) in 3 ml wassergesättigtem Chloroform und verrieben die

165) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER, G.RICHTER u. F.ASMUS, Veröffentlichung in Vorbereitung

Lösung mit 1 g Formaldehydzellulose zur Trockne. Die Verreibung gaben wir vorsichtig auf die Säule und chromatographierten bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 8 Tropfen/Min. über eine Strecke von 43 cm. Das Eluat wurde durch den Fraktions-schneider in 30 Anteile von je 3.5 ml aufgetrennt, im Vakuum eingeeengt und papierchromatographisch untersucht.

4. Präparative Verteilung in Schütteltrichtern

Als Verteilungssystem diente ein Gemisch aus 3560 ml Tetra-chlorkohlenstoff, 2640 ml Methanol, 348 ml Wasser, 708 ml Pyridin und 860 ml Petroläther.

Nach 1stündiger gegenseitiger Absättigung erfolgte die Auftrennung der beiden Phasen. In jeden der 15 500 ml Schüttel-trichter brachten wir 200 ml Oberphase. Dann füllten wir in den Schütteltrichter 1 (= Element 1) 200 ml Unterphase ein und lösten in Ober- und Unterphase 20 g Folch 1-Fraktion. Nach 40 Schüttelvorgängen und Abtrennung der Phasen füllten wir die Unterphase 1 in Schütteltrichter 2 und beschickten Element 1 mit 200 ml neuer Unterphase. Auf diese Weise führten wir 15 Verteilungsschritte durch.

In einem Fall war es nötig, den in Element 1 nach Auflösung der Substanz beobachteten Schwund an Unterphase durch Wasserzugabe auszugleichen. Die weitere Verteilung verlief ohne Störung.

Die Ober- und Unterphasen sammelten wir getrennt in 250 ml Stehkolben und dunsteten das Lösungsmittel bei 30°C und 30 Torr über Calciumchlorid ab. Die Unterphasen 14 und 15, in denen der DPI-K zu erwarten war, engten wir im Rotationsverdampfer nach Büchi bei 28°C unter Einblasen von Stickstoff ein. Nach Trocknen der Ober- und Unterphasen über Phosphorpentoxid und Paraffin im Exsiccator ergaben sich folgende aus Tabelle 14 ersichtlichen Auswaagen:

T a b e l l e 14
Auswaagen der Ober- und Unterphasen

Unterphasen				Oberphasen			
Phase Nr.	g	Phase Nr.	g	Phase Nr.	g	Phase Nr.	g
1	0.22	9	1.07	1	0.15	9	1.68
2	0.26	10	0.74	2	0.25	10	0.88
3	0.3	11	0.45	3	0.5	11	0.25
4	0.37	12	0.25	4	0.65	12	0.2
5	0.48	13	0.19	5	0.85	13	0.15
6	0.55	14	0.55	6	1.08	14	0.12
7	0.82	15	2.54	7	1.31	15	0.12
8	0.85			8	1.67		

Nach der papierchromatographischen Prüfung wurden die Verteilungsstufen, wie aus der folgenden Übersicht hervorgeht, zusammengefaßt und bei -20° unter Stickstoff aufbewahrt.

Zusammengefaßte Oberphasen (O)
und Unterphasen (U):

Darin enthaltene Substanzen:

O 1 - 3	Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Ganglioside
U 1 - 2	Phosphatidylserin und Monophosphoinositid
O 4 - 10 und U 3 - 12	Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und Monophosphoinositid
O 11 - 15 und U 13	Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Diphosphoinositid 1
U 14 - 15	Diphosphoinositid 1 und Diphosphoinositid 2

Anorganisches Phosphat ist in allen Stufen vorhanden, jedoch in U 14 - 15 stark angereichert. Geringe Mengen freier Aminosäuren waren ebenfalls in allen Verteilungselementen nachzuweisen.

5. Reinigung des Diphosphoinositidkomplexes durch Zellulose-
säulenchromatographie¹⁶⁶⁾

85 g Zellulosepulver 123a (Schleicher u. Schüll) wurde in der Unterphase des gesättigten Fließmittelsystems Chloroform/Äthanol/Wasser (80:20:2.5) suspendiert und in eine Säule eingefüllt. Säulenlänge 22 cm; Säulendurchmesser 4.4 cm. Die Zellulose wurde 4mal mit je 150 ml Fließmittel gewaschen. Dann lösten wir 1.27 g der Substanz U 14 - 15 in 25 ml des Laufmittelsystems, trugen diese Lösung auf und chromatographierten bei einem Durchfluß von 95 - 100 Tropfen/Min.

Wenn die schwach grau-gelblich gefärbte Phosphatidzone den untersten Säulenabschnitt erreicht hatte, wurde die Vorlage gewechselt und mit ca. 150 ml wassergesättigtem Chloroform nachgedrückt. Der eluierte DPI-K enthielt nach papierchromatographischer Prüfung noch anorganisches Phosphat und wog 0.635 g. Deshalb schlossen wir eine zweite Säulenreinigung an. Daraus resultierte 0.508 g DPI-K, der nur noch 0.92% anorganisches Phosphat enthielt und völlig frei von Aminosäuren war. Mit Zellulosesäulen von 1 - 1.6 cm Durchmesser gelingt bei Verwendung der gleichen Fließmittel eine quantitative Entfernung des anorganischen Phosphats in 2 Arbeitsgängen. Doch reichte die Kapazität dieser kleinen Säulen für die vorliegenden Substanzmengen nicht aus.

¹⁶⁶⁾ R.H.SMITH, Biochem.J. 57, 130 (1954)

B. Analytik des Diphosphoinositidkomplexes

I. Papierchromatographie

1. Silikagelpapier 289 der Firma Schleicher u. Schüll.

Fließmittel: Methanol/Chloroform(1:4) und Diisobutylketon/
Eisessig/Wasser (40:30:7)

2. Glasfaserpapier 6 der Firma Selecta.

Fließmittel: Diisobutylketon/Eisessig/Wasser (45:5:6).
Die Ergebnisse der Verfahren 1 und 2 waren negativ.

3. Formaldehydpapier nach HÖRHAMMER und Mitarbeitern¹⁶⁷⁾

Wir imprägnierten in einem Arbeitsgang 50 Bogen Ederol-
papier 208 bei 12 Atmosphären in einer Formaldehydlösung
von pH 2.8.

Zum Auftragen der Substanzen zogen wir Startlinien, die bei
der aufsteigenden Methode 2.5 cm und beim absteigenden Ent-
wicklungsverfahren 7 cm vom Rand des Chromatogramms ent-
fernt waren. Die Substanzen wurden meist in Form von 1.2 -
1.5 cm langen Strichen aufgetragen, die 2.5 - 3 cm Abstand
voneinander besaßen. Diese Methode bringt durchschnittlich
bessere Auftrennungen als das punktförmige Aufbringen der
Substanzen. Zum Auftragen des DPI-K und anderer Phosphatide
diente eine ca. 0.2%ige Lösung der jeweiligen Substanz in
der Unterphase des Gemisches Chloroform/Äthanol/Wasser
(80:20:2.5). Für qualitative Untersuchungen trug man die
Lösung mit Blutzuckerpipetten auf, während für quantitative
Phosphatidbestimmungen aus dem Chromatogramm mit einer Agla-
Mikrometer-Spritze dosiert wurde. Die aufgetragene Phospha-
tidmenge betrug in der Regel 100 - 500 µg für die aufstei-
gende und 300 - 2000 µg für die absteigende Methode.

Fließmittel: Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5).

167) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte aufsteigend über 26 - 28 cm (Laufzeit 12 Std. bei 18°C) und absteigend über 35 - 45 cm (Laufzeit 16 Std. bei 18°C). Bei auf- und absteigender Methode ist die Auftrennung des DPI-K etwa gleich gut, doch besitzt das Papier bei absteigender Entwicklung eine etwa 4fache Trennkapazität. Wir chromatographierten Gesamtextrakte mit relativ wenig DPI-K bevorzugt absteigend, da so große Substanzmengen aufgetragen werden konnten, daß auch ein geringer Diphosphoinositidanteil noch in Erscheinung trat.

Die durchschnittlichen R_F -Werte der wichtigsten Gehirnphosphatide und ihrer Begleitsubstanzen in den Laufmitteln Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser (45:5:6) sind in der folgenden Tabelle 15 zusammengefaßt.

T a b e l l e 15

R_F -Werte von Gehirnphosphatiden und Begleitsubstanzen mit 2 Fließmittelsystemen

Substanz	R_F -Werte mit A	R_F -Werte mit B
Lecithin (Phosphatidylcholin)	0.79	0.4
Phosphatidyläthanolamin	0.79	0.46
Phosphatidylserin	0.63	0.41
Monophosphoinositid	0.52	0.3
Diphosphoinositid 1	0.37	0.68
Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)	0.30	0.68
Gangliosid 1	0.26	-
Gangliosid 2	0.21	-
Anorganisches Phosphat	0.16	0

Zeichenerklärung: A = Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)

B = Tetrahydrofuran/Diisobutylketon/Wasser
(45:5:6)

Sichtbarmachen der Flecke:

- a) Nilblaufärbung (0.05%ig) auf saure Lipide. Anfärbung: 10 Min., Auswaschen in fließendem Wasser: 5 - 6 Std.
- b) Malachitgrünfärbung (0.05%ig) auf Phospholipide und ihre Lysoformen. Anfärbung: 10 Min., Auswaschen in fließendem Wasser: 1 - 2 Std. Lysoverbindungen erscheinen beim Trocknen als weiße Flecken auf hellgrünem Grund.
- c) Rhodaminfärbung (0.1%ig) auf Phospholipide. Methodik wie bei Malachitgrünfärbung.
- d) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure. Reagiert mit allen phosphorsäurehaltigen Verbindungen.
Zusammensetzung: Ammoniummolybdatlösung 4% (25 ml), 1 n Salzsäure (10 ml), Perchlorsäure 72% (5 ml) und Aqua dest. (ad 100 ml). Besprühen und 7 Min. auf 85° erhitzen. Anschließend Chromatogramme mit strömenden Wasserdampf behandeln und zur Reduktion des Phosphor-Molybdänsäure-Komplexes 1 - 2 Sekunden in Schwefelwasserstoffkammer einbringen. Es entstehen blaue Flecken auf weißem Grund.
- f) Osmiumtetroxydfärbung auf ungesättigte Fettsäuren und Aldehydgruppen sowie sämtliche Lipide mit derartigen Komponenten. 1stündiges Bedampfen der Chromatogramme mit Osmiumtetroxyd. Reduktion des Oxyds zu elementarem Osmium und dadurch Braun-Schwarzfärbung.
- g) Direkter Inositnachweis auf dem Papierchromatogramm NAGAI und KIMURA¹⁶⁸⁾ weisen das Inosidtriphosphat unmittelbar auf dem Papierchromatogramm nach, indem sie die Esterbindungen mit 1n Salzsäure bei 95° hydrolysieren und dann den Scherertest durchführen. Zum Nachweis des Monophosphoinositids werden 300 µg Substanz chromatographiert, das Chromatogramm mit 2 n Kalilauge kräftig besprüht und an der Luft getrocknet. Anschließend taucht man das Chromatogramm 3mal in 10%ige alkoholische Salpetersäure ein und trocknet jedesmal anschließend 10 Min. bei 95° - 100°.

168) Y.NAGAI u. Y.KIMURA, Nature (London) 181, 1730 (1958)

Dabei wird Inosit zur Rhodizonsäure oxydiert. Nach Neutralisation der restlichen Salpetersäure durch Ammoniak badet man das Chromatogramm in einer Lösung von 40 ml n-Butanol, 10 ml Eisessig, 10 ml einer 10%igen wässrigen Bariumacetatlösung und 0.5 g Calciumchlorid und erhitzt dann 4 - 5 Min. auf 95 - 100°. Dabei entsteht orangefarbenes Bariumrhodizonat, das durch Besprühen mit einer Lösung von 5 g Calciumchlorid in 100 ml 50%igem Äthanol in rosafarbenes Calciumrhodizonat übergeführt wird.

Der Nachweis des DPI-K gelingt mit diesem Verfahren nicht.

II. Versuche zur weiteren Auftrennung des Diphosphoinositidkomplexes durch Craig-Verteilung

40 mg DPI-K wurden in einem Verteilungssystem aus 300 ml Methanol, 375 ml Benzin (65 - 95°) und 12 ml Wasser mit der HECKER'schen Apparatur über 28 Stufen verteilt. Das Phasenvolumen betrug 10 ml. Zur Chromatographie faßte man je 4 Ober- und Unterphasen zusammen und chromatographierte aufsteigend. Dabei ergab sich folgendes Bild:

Unterphasen 1 - 12: Diphosphoinositid 1 (ca. 500 µg). Alle übrigen Phasen enthielten die Diphosphoinositide 1 und 2, wobei sich die Hauptmenge der Substanz (35 mg) in den Oberphasen 25 - 28 angereichert hatte.

Ebenfalls eine Abtrennung geringster Mengen Diphosphoinositid 1 war mit dem modifizierten System aus 298 ml Tetrachlorkohlenstoff, 220 ml Methanol, 34 ml Wasser, 34 ml Pyridin und 72 ml Petroläther zu erzielen. Die Verteilung lief über 28 Schritte bei 10 ml Phasenvolumen und 40 mg eingesetztem DPI-K. Das Ergebnis wurde papierchromatographisch ermittelt:

Oberphasen 1 - 28: Diphosphoinositid 1 (ca. 500 µg). Die Unterphasen 1 - 28 enthielten Diphosphoinositid 1 und 2, wobei sich 90% der verteilten Substanz in den Unterphasen 1 und 2 fanden. Ähnlich verlief eine Verteilung mit dem System Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser (62:35:6).

III. Saure und alkalische Hydrolysen

1. Milde alkalische Hydrolyse nach DAWSON¹⁶⁹⁾

6 mg DPI-K wurden in 0.8 ml wassergesättigtem Chloroform (anstelle von Tetrachlorkohlenstoff) aufgenommen und mit 7.5 ml Äthanol, 0.65 ml Wasser und 0.25 ml n-Natronlauge versetzt. Dieser Ansatz wurde 20 Min. bei 37° inkubiert und durch einen Vibro-Mixer dauernd durchmischt. Danach kühlten wir den Ansatz auf ca. 0° ab, gaben ihn zur Entfernung des Alkali über eine Amberlitesäule IRC 50 H⁺ (3 cm x 0.8 cm) und wuschen mit 2mal 5 ml Äthanol (80%ig) nach. Das Eluat engte man zur Trockne ein und verteilte es zwischen 1 ml Oberphase und 2 ml Unterphase des gesättigten Systems aus Wasser/Isobutanol/Chloroform (1:0.66:1.33). Nach Auftrennen der Emulsion durch Zentrifugieren hoben wir die wässrige Oberphase mit einer Pipette ab und untersuchten sie chromatographisch auf wasserlösliche Hydrolyseprodukte, während die Unterphase auf intaktes Phosphatid geprüft wurde.

2. Hydrolysen mit Säuren und 1 n Lauge

Es wurden jeweils ca. 5 - 10 mg DPI-K in wassergesättigtem Chloroform gelöst, 1 ml Säure oder Lauge hinzugefügt und 1 Std. geschüttelt. Dadurch kam die Substanz mit dem hydrolysierenden Agens in engen Kontakt. Dann entfernten wir das Chloroform mittels Durchsaugen von Luft. Dazu wurde das Verseifungskölbchen, in dem sich die Emulsion befand, mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen. In die eine Öffnung führten wir eine Kapillare, die fast bis zum Boden des Gefäßes führte, an die andere legten wir über ein weitleumiges Glasrohr ein Vakuum an und saugten die Luft durch. Nach ca. 5 Min. war das Chloroform entfernt.

- a) Durchführung der Hydrolysen: Erfolgte unter den in Tabelle 6 (Seite 32) angegebenen Bedingungen.
- b) Auftrennung der hydrophilen und hydrophoben Hydrolyseprodukte: Wir verdünnten die sauren Hydrolysate auf 5 ml

169) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 75, 45 (1960)

durch Wasserzusatz und schüttelten die Fettsäuren mit 2mal 5 ml Äther aus. Die Ätherausschüttelungen wurden 2mal mit 1 ml Wasser gewaschen und auf Fettsäuren untersucht. Die Ansätze mit 1 n Lauge säuert man mit Eisessig an und schüttelt den Fettsäureanteil ebenfalls mit Äther aus. Da sich intakt gebliebener DPI-K in Chloroform besser als in Äther löst, wurden die Hydrolysate anschliessend noch mit 3 ml Chloroform ausgeschüttelt und dieser Auszug durch Chromatographie auf Formaldehydpapier auf nicht hydrolysiertes Phosphatid untersucht. Die wässrigen Anteile enthielten noch Salzsäure, bzw. Essigsäure. Um diese zu entfernen, fügt man mehrmals 2 ml Wasser hinzu, das anschließend durch Claisendestillation abgedampft wird. Die säurefreien Rückstände wurden auf wasserlösliche Hydrolyseprodukte untersucht.

3. Papierchromatographische Untersuchung wasserlöslicher Hydrolyseprodukte

Es wurde in allen Fällen mit dem Papier 2043 b der Firma Schleicher u. Schüll chromatographiert.

a) Inositnachweis:

Der chromatographische Nachweis dieser Substanz wird bei Anwesenheit von anorganischen Salzen durch Verschiebung des R_f -Wertes und Abschwächung der Anfärbereaktion gestört. Deshalb wurde das wässrige Hydrolysat nach Einengen auf 2 - 3 ml zuerst mit 1 g Anionenaustauscher Amberlite IR 400 und dann mit 1 g Kationenaustauscher Amberlite IR 400 jeweils 15 Min. geschüttelt und dadurch von anorganischen Salzen bis auf Spuren gereinigt. Anschließend engt man auf ca. 0.5 ml ein und chromatographiert aufsteigend und 2 dimensional über eine Wegstrecke von je 30 cm mit Isopropanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) (17 Std.) und Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) (15 Std.). Die Anfärbung erfolgt mit ammoniakalischer Silbernitratlösung¹⁷⁰⁾.

170) H.F.LINSKENS, Papierchromatographie in der Botanik, Berlin-Göttingen-Heidelberg, p.60 (1955)

R_F -Werte des Inosits: Mit Isopropanol/Eisessig/Wasser

$$R_F = 0.185$$

Mit Butanol/Eisessig/Wasser

$$R_F = 0.095$$

Der Nachweis des Inosits in beiden Komponenten des DPI-K wurde nach der auf S.105 eingehend beschriebenen Methode geführt: 15mal 200 µg DPI-K chromatographisch auftrennen, Phosphatidflecke ausschneiden, mit 30 ml Chloroform/Äthanol/Wasser (80:20:2.5) (Unterphase) 2mal 8 Stunden am Rückflußkühler extrahieren, Extrakte einengen und mit jeweils 0.6 ml 6 n Salzsäure hydrolysieren, Identifizierung des Inosits wie oben beschrieben.

b) Nachweis von Glycerinphosphat, Inositphosphaten und anorganischem Phosphat:

Es kamen 3 Fließmittel zur Anwendung:

Fließmittel I : Phenol, abgesättigt mit dem Gemisch Wasser/Essigsäure/Äthanol (100:10:12), aufsteigend 27 cm (15 Std.)

Fließmittel II : n-Propanol/Ammoniak (25%)/Wasser (5:4:1) absteigend 35 cm (18 Std.)

Fließmittel III : Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5), aufsteigend 24 cm (12 Std.)

Anfärbemittel: Ammoniummolybdat-Perchlorsäure.

Substanz	Fließmittel I	Fließmittel II	Fließmittel III
	R_F	R_F	R_F
Glycerinphosphat	0.31	0.51	0.18
Inositdiphosphat (vermutlich)	0-0.05	0.29	-
Inosittriphosphat (vermutlich)	0-0.05	0.18	-
anorg.Phosphat	0.23	0.35	0.16

c) Nachweis der Aminosäuren:

Wir fertigten 1- und 2-dimensionale Chromatogramme an und machten die Aminosäuren mit Ninhydrinlösung¹⁷¹⁾

¹⁷¹⁾ R.CONSDEN, A.H.GORDON u. A.J.P.MARTIN, Biochem.J. 38,224 (1944)

sichtbar. Bei absteigender Entwicklung über 50 cm (24 Std.) und dem Fließmittel Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) ergaben sich fünf deutlich und zwei schwach angefärbte Flecken mit folgenden R_f -Werten:

Auf Grund der ebenfalls chromatographierten Testsubstanzen kommen für die einzelnen R_f -Werte folgende Aminosäuren in Frage:

Fleck 1	$R_f = 0.14$	Glykokoll, Serin
Fleck 2	$R_f = 0.21$	Glutaminsäure, Threonin
Fleck 3	$R_f = 0.23$	Glutaminsäure, Threonin
Fleck 4	$R_f = 0.28$	Alanin
Fleck 5 (Spuren)	$R_f = 0.33$	Prolin, Tyrosin, Alanin
Fleck 6 (Spuren)	$R_f = 0.48$	Valin, Methionin
Fleck 7	$R_f = 0.64$	Leucin, Isoleucin

Die 2-dimensionale Chromatographie der Aminosäuren wurde mit Phenol/Wasser (8:2) aufsteigend über 30 cm (24 Std.) und mit Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) absteigend über 50 cm (48 Std.) durchgeführt. Chromatogramme mit Testsubstanzen wurden in analoger Weise angefertigt und von den nach 2-dimensionaler Chromatographie sichtbaren 5 Aminosäureflecken des Hydrolysates durch Vergleich Glykokoll, Alanin und Leucin oder Isoleucin identifiziert.

4. Papierchromatographische Untersuchung der Fettsäuren:

Eine grobe Fraktionierung in den gesättigten und den ungesättigten Fettsäureanteil gelang durch 2maliges je 24 stündiges Abkühlen der Gesamtfettsäuren in 0.5 - 1 ml Aceton bei -25°C . Dabei fielen die gesättigten Fettsäuren größtenteils aus und konnten abzentrifugiert werden. Hierzu wurden 40 mg DPI-K hydrolysiert, da die Fraktionierung mit geringeren Fettsäuremengen nicht gelingt.

Chromatographiert wurde nach POKORNY¹⁷²⁾ auf paraffinimprägniertem Papier (10%ige Paraffinlösung in Petroläther)

172) J. POKORNY, Naturwissenschaften 43, 375 (1956)

und Eisessig aufsteigend über 25 cm (16 Std.) und nach dem "reversed-phase"-Verfahren, wobei mit 20%iger Paraffinlösung imprägniert und mit 90%iger Essigsäure entwickelt wurde. Die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren bilden mit Kupferacetat und Kaliumferrocyanid rotbraune, schwerlösliche Kupferseifen. Darüber hinaus erscheinen die ungesättigten Fettsäuren durch Bedampfen mit Osmiumtetroxyd nach 50 Minuten als dunkelbraune, später schwarze Flecken. Zum Vergleich wurden die Fettsäuren einer Folch 1-Fraktion ebenfalls untersucht.

Fettsäuren des DPI-K	Fettsäuren der Folch 1-Fraktion	Paraffin 10% Eisessig R_f	Paraffin 20% Essigsäure 90% R_f
Stearinsäure	Stearinsäure	0.63	0.23
-	ungesättigte F.S. (vermutlich Eikosen- säure)	0.63	0.23
Palmitinsäure	Palmitinsäure	0.74	0.33
Ölsäure	Ölsäure	0.74	0.33
Linolsäure	Linolsäure	0.83	0.45
Linolensäure	Linolensäure	0.88	0.58
-	ungesättigte F.S. (vermutlich C_{20}^- Pentaensäure)	0.92	0.67

5. Nachweis des Glyzerins:

5 mg des DPI-K wurden mit 5 mg Zinkoxyd, 5 mg Zinkstaub, 12.5 mg Seesand und 1 Tropfen Wasser fein verrieben. Nach dem Trocknen unter der IR-Lampe füllten wir die Verreibung in eine Ampulle von 0.3 ml ein, setzten erneut 1 Tropfen Wasser zu, schmolzen die Ampulle zu und erhitzen 3 Stunden bei 160° im Trockenschrank. Nach vorsichtigem (!) Öffnen der Ampulle wurde das Substanzgemisch 2mal mit 0.2 ml Wasser extrahiert.

Den trüben wässrigen Extrakt klärten wir durch Zentrifugieren bei 1500 U/Min. Die Hälfte davon (ca. 0.2 ml) wurde

punktförmig auf Schleicher u. Schüll-Papier 2043 b aufgetragen und mit Isopropanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) aufsteigend über 24 cm chromatographiert. Die Anfärbung erfolgte, indem nacheinander mit 1%iger Natriumperjodatlösung und 1%iger Kaliumpermanganatlösung besprüht wurde. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Permanganats trat Glyzerin ($R_F = 0.65$) in Form brauner Flecken in Erscheinung und konnte mit Hilfe von Testsubstanz eindeutig identifiziert werden.

IV. Enzymatische Hydrolyse

1. Spaltungsversuche mit Bienengift in ätherischer Lösung

Dazu lösten wir 5 Teile eines Gemisches von etwa je 50% Monophosphoinositid und Phosphatidylserin in 100 Teilen Äther. Diese Lösung wurde mit dem gleichen Vol. Teil eines Puffersystems von pH 7.5 versetzt, das aus 0.1 m Veronal-Na Lösung (59.8 Vol. %) und 0.1 n Salzsäure (40.2 Vol. %) bestand. In 100 Teilen Puffer waren 0.75 Teile Bienengift^{*)} gelöst. Die beiden Lösungen wurden gemischt, 15 Min. umgeschüttelt und 12 Std. bei Zimmertemperatur belassen. Innerhalb dieser Zeit reicherte sich zwischen der klaren Ober- und Unterphase eine gallertige Masse an, die durch Zentrifugieren abgetrennt werden konnte und aus Lysoverbindungen bestand. Auch Ober- und Unterphase des Ansatzes enthielten noch geringere Mengen von Lysoverbindungen. Für die papierchromatographische Untersuchung war es jedoch nicht notwendig, die Phasen aufzutrennen und einzeln zu untersuchen. Deshalb schüttelten wir den Gesamtansatz kurz durch und chromatographierten von der Emulsion aliquote Teile, die 100 - 200 µg Phosphatid entsprachen, auf Formaldehydpapier.

*) Wir danken der Firma Mack, Illertissen, für die freundliche Bereitstellung des Bienengiftes.

2. Spaltungsversuche mit Bienengift in Chloroformlösung

Die 1%ige Lösung von Phosphatidylserin, Phosphatidyläthanolamin und Monophosphoinositid in Chloroform versetzten wir mit dem gleichen Volumen eines Puffers mit pH 8.4, der aus Veronal-Na (1.059 g), Natriumacetat (0.699 g), Natriumchlorid (0.246 g), 1 n Salzsäure (0.72 g) und Wasser (ad 180 ml) bestand und 0.3% Bienengift enthielt. Der Ansatz wurde 1 Std. geschüttelt und dann 12 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die zunächst gebildete stabile Emulsion trennte sich innerhalb dieser Zeit auf. Zwischen der klaren Ober- und Unterphase hatte sich eine dünne, milchig-weiße hautartige Schicht angereichert. Die wässrige Oberphase enthielt nur Spuren von Lysoverbindungen. Diese befanden sich vor allem in der Unterphase. Zur papierchromatographischen Prüfung schüttelten wir den Ansatz um und trugen von der gebildeten Emulsion aliquote Teile auf Formaldehydpapier auf.

3. Papierchromatographische Untersuchung der Lysoverbindungen

10 Min. Anfärbung in 0.05%iger Malachitgrünlösung, 1-2 stündiges Wässern, Grünfärbung sämtlicher Phosphatide und der mit der Fließmittelfront wandernden abgespalteten Acetale und Fettsäuren. Beim Trocknen Ausbleichen oder Hofbildung der Lysoverbindungen.

R_f -Werte: Lysophosphatidyläthanolamin = 0.66;

Lysophosphatidylserin = 0.46;

Lysononophosphoinositid = 0.35.

V. Quantitative Bestimmung der Elemente und Spaltprodukte

1. Gesamtphosphorbestimmung

Diese Bestimmung erfolgte nach WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹⁷³⁾, die das Verfahren von LOWRY und Mitarbeiter¹⁷⁴⁾

173) H. WAGNER, A. LISSAU, J. HÖLZL u. L. HÖRHAMMER, J. Lipid Research 3, 177 (1962)

174) O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, K. Y. LEINER, MEI-LING WU u. A. L. FARR, J. biol. Chemistry 207, 1 (1954)

modifiziert hatten. Sie weicht von der auf Seite 100 eingehend erläuterten Bestimmung des Phosphatidphosphors aus den Chromatogrammflecken insofern ab, als dort die ausgeschnittenen Chromatogrammflecken, hier dagegen die Phosphatide unmittelbar naß verascht werden.

Durchführung der Bestimmung: Veraschen mit 0.4 ml Perchlorsäure (72%). Zusatz von 2 ml Wasser und 5 Min. in siedendes Wasserbad, Versetzen mit 0.3 ml 2.5%iger Ammoniummolybdatlösung und 0.3 ml 10%iger Ascorbinsäurelösung, 2 Std. bei 38° inkubieren, Messung der Blaufärbung bei 820 mμ und d = 1 im Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II) gegen eine Blindlösung, die alle Reagenzien enthält.

$$\text{Berechnung: } \mu\text{g P} = \frac{\text{Ext. I} \cdot \text{Menge P } (\mu\text{g}) \text{ des Vergleichswertes}}{\text{Ext. II}}$$

Ext. I = Extinktion absolut

Ext. II = Extinktion der Phosphorvergleichslösung
= 0.583 (2 μg P)

Einwaagen: Ätherextrakt des Rinderhirns: 22.9 mg/100 ml
Folch 1-Fraktion des Rinderhirns: 17.6 mg/100 ml
DPI-K des Rinderhirns: 9.725 mg/10 ml

T a b e l l e 16
Gesamtphosphorbestimmung

Substanzlösung	Aliquoter Teil ml	Verdünnung	Ext. gem.	Ext. absol.	μg P	% P	MW
Ätherextr.	0.2		0.358	0.358	1.228	2.68	2.64
Ätherextr.	0.2		0.345	0.345	1.18	2.57	
Folch 1-Frakt.	0.2		0.53	0.53	1.82	5.17	5.1
Folch 1-Frakt.	0.2		0.515	0.515	1.77	5.028	
Diphosphoinositidkomplex	0.1	3	0.678	2.034	6.98	7.18	7.18
Diphosphoinositidkomplex	0.1	3	0.678	2.034	6.98	7.18	
Diphosphoinositidkomplex	0.1	3	0.67	2.01	6.89	7.09	

MW = Mittelwert

2. Bestimmung des Gesamtstickstoff

Die volumetrische Stickstoffbestimmung nach DUMAS wurde vom mikroanalytischen Laboratorium der Firma A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Substanz	Einwaage mg	cm ³ N ₂ +°/pmm	% N
Ätherextrakt	5.528	0.082	1.64
Folch 1-Fraktion	6.587	0.092	1.55
Diphosphoinositid- komplex	6.332	0.015	0.26

3. Inositbestimmung

Sie erfolgte mikrobiologisch nach McKIBBIN¹⁷⁵⁾. Dazu mußten die analysierten Substanzen, Folch 1-Fraktion und DPI-K bis zur totalen Abspaltung des veresterten Inosits hydrolysiert werden.

Hydrolyse: Aus den Substanzlösungen bekannten Gehalts wurden aliquote Teile, deren Gehalt an Inosit voraussichtlich zwischen 25 - 100 µg lag, in Pyrexglasampullen von 2 cm Durchmesser eingefüllt. Nach dem Trocknen fügten wir je 10 ml 4 n Salzsäure hinzu, schmolzen die Ampullen zu und hydrolysierten 16 Stunden bei 120° im Trockenschrank. Nach Verdünnen mit 20 ml Wasser folgte 2maliges Ausschütteln mit je 15 ml Chloroform zur Entfernung der Fettsäuren. Die überschüssige Salzsäure ließ sich durch Claisendestillation unter mehrmaliger Wasserzugabe entfernen. 10 ml der wässrigen Lösung wurden mit 0.2 n Natronlauge auf pH 4.5 - 5 eingestellt und auf 25 ml aufgefüllt.

Hefestammlösung: *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 wurde 24 Stunden vor dem Versuch auf einen Nährboden aus sterili-

¹⁷⁵⁾ J.M.McKIBBIN in D.Glick (Editor), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. III, Interscience Publishers, New York, p. 119 (1959)

sierter Bierstammwürze (mit 1% Agar Agar) übergeimpft und 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Nach 24 Stunden brachten wir eine geringe Menge der Kultur in 10 ml sterile 0.9%ige Kochsalzlösung ein und ermittelten die Extinktion der Suspension bei 600 m μ gegen Luft. 5 ml der Kulturlösung mit der Extinktion 0.42 oder eine äquivalente Menge (bei $E_{\text{absolut}} = 1.08$ wurden 2.08 ml zugegeben) wurden zu 95 ml steriler 0.9%iger Kochsalzlösung gegeben, die damit 0.034 mg Hefe pro 1 ml enthielt.

Nährmedien:

Lösung I - 1 Liter. Glukose (200 g), KH_2PO_4 (2.2 g), KCl (1.7 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), MnSO_4 (0.01 g), FeCl_3 (0.01 g).

Lösung II - 1 Liter. Kaliumcitrat (100 g), Zitronensäuremonohydrat (20 g).

Lösung III - 100 ml. Thiamin $\cdot$ HCl (10 mg), Pyridoxin $\cdot$ HCl (10 mg), Calciumpantotenat (100 mg), Biotin (1 mg), Cholinchlorid (600 mg).

Lösung IV - 15% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

Lösung V - Caseinhydrolysat 10%. Vitaminfreies Caseinhydrolysat der Firma Difco.

200 ml Nährmedium wurden gemischt aus: 100 ml I, 20 ml II, 10 ml III, 10 ml IV, 20 ml V und 40 ml H_2O . Durch Zugabe von 10%iger Natronlauge ließ sich der pH auf 4.38 einstellen.

Bestimmung:

In 50 ml Erlenmeyerkolben füllten wir jeweils 5 ml Nährlösung ein und ergänzten 2 davon mit je 5 ml Wasser (Blindwerte). Zur Ermittlung der Eichwerte wurden je 2 Ansätze mit 1, 2, 3 und 4 ml einer Standardinositlösung (2 μg pro 1 ml) versetzt. Von den Hydrolysaten stellten wir Ansätze mit 1 und 2 ml her und brachten sämtliche Volumina mit Wasser auf

10 ml. Nach Sterilisation wurde jeweils mit 1 ml Hefestamm-
lösung geimpft, im Thermostaten 16 Stunden bei 30° bebrütet
und anschließend das Hefewachstum im Kühlschrank (30 Min.)
gestoppt. Die Trübungsgrade der Ansätze beruhen auf dem He-
fewachstum und stellen ein direktes Maß für den Inositge-
halt dar. Sie wurden im Zeiss-Spektralphotometer gegen die
Blindlösungen ausgemessen (Tabelle 17).

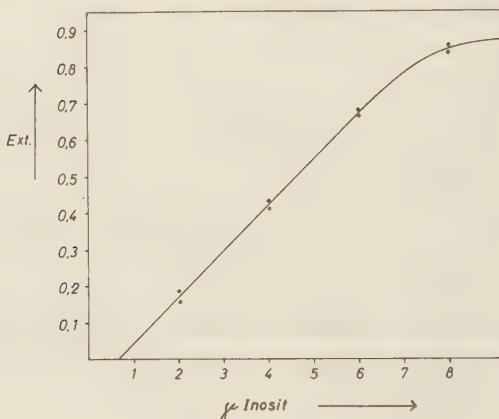


Abb. 9

Eichkurve von Inosit bei 600 mμ

Die Eichkurve ist nur im Konzentrationsbereich 1 - 6 μg
(γ) linear.

T a b e l l e 17
Inositbestimmung

Substanz	Einwaage mg / ml	Aliquoter Teil für Hydrolyse ml	Aliquoter Teil (von 25 ml Hy- drolysat) ml	Ext.	Inosit µg	Inosit % MW
Folch 1- Fraktion	29.2/10	0.5	1	0.288	2.92	5.13
	29.2/10	0.5	1	0.315	3.14	
	29.2/10	0.5	2	0.66	5.9	
	29.2/10	0.5	2	0.666	5.96	
DPI-K	9.725/10	0.5	1	0.295	2.96	14.94
	9.725/10	0.5	1	0.29	2.92	
	9.725/10	0.5	2	0.65	5.8	
	9.725/10	0.5	2	0.63	5.67	

4. Plasmalbestimmung

Diese Methode wurde von FEULGEN und Mitarbeitern¹⁷⁶⁾ entwickelt und durch KLENK modifiziert. Die Substanzen lösten wir in Eisessig und gaben je 0.1 ml davon in Reagenzgläser. Nach Zugabe von 0.1 ml 2 n essigsäurer HCl hydrolysierten wir 5 Minuten bei 55°C im Wasserbad und neutralisierten die abgekühlten Lösungen mit 0.11 ml 2 n Natronlauge. Nach Zugabe von 1 ml fuchsinschwefliger Säure blieben die Reagenzgläser 20 Minuten verschlossen stehen, wobei sich violette Färbung ausbildete. Dann fügten wir den Ansätzen 2ml Verdünnungsflüssigkeit und 4 ml Amylalkohol zu, schüttelten den Farbstoff 1 Minute aus und kühlten in Eiswasser. Durch kurzes Zentrifugieren trennten sich die violetten Oberphasen gut ab und ließen sich abpipettieren. Die Menge des zugesetzten Amylalkohols richtete sich nach der Farbtintensität der Lösung. Die Messung erfolgte im Zeiss-Spektralphotometer bei 546 mµ gegen Amylalkohol als Blindlösung (d = 1). Die Herstellung der benötigten Reagenzien ist zu ersehen aus "Analyse der Fette" I, H.P.Kaufmann, S.999, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958).

176) R.FEULGEN, W.BOGUTH u. G.ANDRESEN, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 287, 90 (1951)

$$\text{Berechnung: \% Plasmal} = \frac{\text{Ext.} \cdot \text{F} \cdot \text{Verd.} \cdot 100 \mu\text{g}}{\text{Einwaage in } \mu\text{g}}$$

Ext. = Extinktion

F = Faktor = 10.5 (Mittelwert aus

$F_{\text{Stearinaldehyd}} = 11$ und

$F_{\text{Palmitinaldehyd}} = 10$)

Verd. = Verdünnung mit Amylalkohol

T a b e l l e 18
Plasmalbestimmungen

Substanz	Einwaage mg	Verd. Eisessig ml	aliquot. Teil	Verd. Amyl- alkoh.	Ext.	% Plas- mal	MW
Folch 1- Fraktion	92.14	25	0.1	4	0.435	4.95	4.865
Folch 1- Fraktion	92.14	25	0.1	4	0.42	4.78	
DPI-K	19.45	5	0.1	4	0.168	1.812	1.824
DPI-K	19.45	5	0.1	4	0.17	1.835	

5. Estervergleichszahl

Nach einem modifizierten Verfahren von SNYDER und STEPHENS 177) lösten wir die zu untersuchenden Proben in 0.3 ml Benzol, setzten jeweils 1 ml frisches Hydroxylamin-Reagenz zu und erhitzen die Proben 2 Minuten im Wasserbad bei 65°C. Nach dem Abkühlen wurden je 2.5 ml frisches Eisenperchlorat-Reagenz zugegeben, gemischt und nach 30 Minuten bei 530 mμ im Zeiss-Spektralphotometer gegen eine Blindprobe gemessen (d=1).

$$\text{Berechnung: Estervergleichszahl} = \frac{\text{Ext.} \cdot \text{Molgewicht}}{c \cdot d \cdot k}$$

c = g/l; d = Schichtdicke; k = Materialkonstante

177) F.SNYDER u. N.STEPHENS, Biochim.biophysica Acta 34, 244 (1959)

T a b e l l e 19
Estervergleichszahlbestimmung

Substanz	Einwaage mg	Verdünnung ml	aliquot. Teil ml	Ext.	Estervergleichszahl	MW
Ätherextrakt	22.9	5	0.25	0.421	1030	1026
Ätherextrakt	22.9	5	0.25	0.419	1022	
Folch 1-Fraktion	17.6	5	0.25	0.38	1210	1146
Folch 1-Fraktion	17.6	5	0.25	0.34	1082	
DPI-K	19.45	10	0.5	0.33	1198	1263
DPI-K	19.45	10	0.5	0.353	1267	

Den Berechnungen zu Grunde gelegte Molekulargewichte:
Ätherextrakt = 800; Folch 1-Fraktion = 800; DPI-K = 1000

6. Quantitative Bestimmung der Fettsäuren

Nach einer Vorschrift von HÖRHAMMER und Mitarbeitern¹⁷⁸⁾ wurden die Substanzen mit 15%iger methanolischer Kalilauge bei Anwesenheit von Ascorbinsäure als Oxydationsschutz 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Verdünnen mit der doppelten Wassermenge ließ sich der unverseifbare Anteil durch mehrmalige Petrolätherausschüttelungen entfernen. Die wässrig-methanolische Lösung brachten wir durch Salzsäure auf pH 2 und schüttelten dann die Fettsäuren mit Äther aus. Die gewaschenen und über Phosphorpentoxyd und Paraffin im Vakuum getrockneten Ätherauszüge wurden zur Wägung gebracht.

Substanz	Einwaage mg	Auswaage an Fettsäuren mg	% Fettsäuren
Folch 1-Fraktion	141.25	62.1	44
Diphosphoinositidkomplex	41.2	12.4	30

178) L.HÖRHAMMER, F.WINTERSBERGER u. H.WAGNER, Archiv Pharm. 292/64, 545 (1959)

VI. Bestimmung einzelner Phosphatide¹⁷⁹⁾

Ätherextrakt, Folch 1-Fraktion und DPI-K des Rinderhirns wurden chromatographisch aufgetrennt, die Phosphatidflecken lokalisiert, ausgeschnitten und genau gewogen. Die Veraschung der Flecken erfolgte in JENAer FIOLAX-Reagenzgläsern unter Zugabe von jeweils 0.4 ml ammoniummolybdathaltiger 72%iger Perchlorsäure durch 4stündiges Erhitzen auf 180°. Die erforderliche Temperatur lieferte ein elektrisch beheizter und mit schrägen Bohrungen (19 x 25 mm) versehener Aluminiumblock, in den die Reagenzgläser eingebracht wurden. Bei Phosphormengen über 10 µg und Papiergewichten über 90 mg wird die Menge der Veraschungssäure und der übrigen Zusätze entsprechend vervielfacht.

Nach der Veraschung verdünnten wir die Ansätze mit jeweils 2 ml Wasser und erhitzen zur Zerstörung von Metaphosphat 10 Minuten im siedenden Wasserbad. Den abgekühlten Mischungen fügten wir unter sofortigem Umschütteln nacheinander je 0.3 ml 2.5%iger Ammoniummolybdatlösung und 10%iger Ascorbinsäurelösung (frisch bereitet) zu und inkubierten für 2 Stunden bei 38°C. Die auftretende Blaufärbung wurde im Zeiss-Spektralphotometer bei 820 mµ (d=1) gegen einen Blindwert gemessen,

Phosphorstandardwerte und die Extinktion des veraschten, leeren Chromatogrammpapiers (Papierblindwert) wurden im Parallelversuch bestimmt.

Extinktion der Phosphorstandardwerte: 2 µg P = 0.56
Extinktion des Papierblindwertes : 33 mg Papier = 0.033

Papierblindwert: Die Extinktion des Papierblindwertes ist dem Papiergewicht proportional. Daher konnten wir das Verhältnis Extinktion:Gewicht in Form einer Geraden graphisch darstellen und anhand der bekannten Papiergewichte die Papierblindwerte sämtlicher Phosphatidflecken ermitteln.

¹⁷⁹⁾ H.WAGNER, Ä.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, J.Lipid Research 3, 177 (1962)

Berechnung des Phosphorgehaltes:

$$P = \frac{(\text{Ext. Chr. Fl.} - \text{Ext. Chr. Pa.}) \cdot \text{Menge P } (\mu\text{g}) \text{ d. Vergl. Wertes}}{\text{Ext. Vergleichswert}}$$

Chr. Fl. = Chromatogrammfleck; Chr. Pa. = Chromatogrammpapier

Berechnung der Phosphatide:

% Phosphatid = % Phosphor $\cdot$ Umrechnungsfaktor

Die der Berechnung zugrunde liegenden Molekulargewichte (bzw. Umrechnungsfaktoren) stellen lediglich Mittelwerte dar, da die Phosphatidmoleküle hinsichtlich ihres Fettsäureanteils uneinheitlich gebaut sind.

Um μg -Mengen für die Bestimmung zur Verfügung zu haben, wurden die Substanzen in bestimmten Volumina gelöst und aliquote Teile aufgetragen.

Einwaagen: Ätherextrakt	:	2370 mg / 50 ml
Folch 1-Fraktion	:	92.1 mg / 25 ml
DPI-K	:	19.6 mg / 10 ml

T a b e l l e 20

Phosphor- und Phosphatidbestimmung aus den Chromatogrammflecken

Phosphatid	Aliquoter Teil ml	mg Papier	Verdünnung	Ext. gem.	Ext. absol.	µg P	% P	Unreinhaltungs-faktor
Untersuchte Substanz: Ätherextrakt								
PC/PÄ	0.031	75	10	0.779	7.728	27.6	1.879	25.0
PS	0.062	58	5	0.76	3.75	13.4	0.456	25.5
MPI	0.062	45		0.755	0.717	2.56	0.087	27.7
DPI 1	0.124	40		0.448	0.414	1.48	0.025	15.3
DPI 2 (TPI)	0.124	33		0.375	0.347	1.24	0.021	11.3
ph	0.062	55	3	0.747	2.1	7.5	0.255	4.0
Untersuchte Substanz: Folch 1-Fraktion								
PÄ	0.07	41		0.496	0.462	1.65	0.64	24.2
PS	0.07	67		1.162	1.106	3.95	1.53	25.5
MPI	0.07	50		0.365	0.323	1.155	0.488	27.7
DPI 1	0.07	44		0.185	0.148	0.53	0.206	15.3
DPI 1 (TPI)	0.07	34		0.182	0.153	0.545	0.212	15.3
DPI 2 (TPI)	0.07	50		0.288	0.246	0.88	0.342	11.3
DPI 2 (TPI)	0.07	50		0.295	0.253	0.905	0.351	11.3
ph	0.07	52	2	0.602	1.16	4.15	1.61	4.0
Untersuchte Substanz: DPI-K								
DPI 1	0.1	58	2	0.748	1.447	5.17	2.637	15.3
DPI 1	0.1	63	2	0.713	1.372	4.9	2.5	15.3
DPI 2 (TPI)	0.1	76	3	0.816	2.385	8.52	4.347	11.3
DPI 2 (TPI)	0.1	82	3	0.79	2.3	8.21	4.19	11.3
ph	0.1	50		0.13	0.126	0.45	0.23	4.0

Abkürzungen (a. Tabelle 20, S. 102):

PC	= Lecithin (Phosphatidylcholin)	(800)*)
PA	= Phosphatidyläthanolamin	(750)
PS	= Phosphatidylserin	(790)
MPI	= Monophosphoinositid	(860)
DPI 1	= Diphosphoinositid 1	(950)
DPI 2	= Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)	(1050)
ph	= anorganisches Phosphat	

*) jeweiliges Molekulargewicht

C. Der Diphosphoinositidkomplex in Lunge, Herzmuskel, Leber,
Niere und Milz

I. Nachweis durch Chromatographie und Autoradiographie

4 Ratten von 102, 110, 118 und 120 g Gewicht erhielten je 0.25 m C ³²P subcutan injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere in Narkose durch Öffnen der Halsschlagader getötet. Die folgende Gefrieretrocknung, Aceton- und Ätherextraktion der einzelnen Organe wurde wie im folgenden Abschnitt (siehe S. 106) durchgeführt. Je 8 mg Ätherextrakt von Rattenhirn, -herzmuskel, -milz, -niere, -leber und -lunge trugen wir strichförmig (1.5 cm) auf Formaldehydpapier auf, chromatographierten absteigend über 40 cm (16 Std.) und färbten zunächst mit Nilblau an. Auf der Höhe des deutlich angefärbten DPI-K aus dem Rattenhirn waren bei den anderen Organen nur sehr schwache Flecken zu erkennen. Anschließend wurden die maximal 40 x 30 cm großen Chromatogramme daher an Röntgenfilme PERUTZ PER-X (40 x 30 cm) angelegt und mit Glasplatten beschwert. Nach 4 Tagen Expositionszeit konnten die Autoradiogramme entwickelt werden. Dazu behandelten wir die Filme 4 Min. mit AGFA-Röntgenentwickler, spülten sie in fließendem Wasser ab und legten sie 30 Min. in ein Fixierbad (125 g saures AGFA Fixiersalz in 1 l Wasser gelöst). Anschließend wurde noch 1 Std. gewässert und an der Luft getrocknet.

Der Nachweis von Inosit in jeder der Diphosphoinositidkomponenten wurde, wie auf Seite 105 näher beschrieben, durch Elution der Chromatogrammflecken am Rückflußkühler, 6stündige Hydrolyse mit 6 n Salzsäure und 2 dimensionale Chromatographie des freien Inosits ausgeführt.

II. Versuche zur Isolierung des Lungendiphosphoinositidkomplexes

1.25 kg (23 g)^{*)} frischer Rinderlunge wurden in weitgehender Analogie zum Isolierungsgang für Rinderhirn-DPI-K aufgearbeitet. Das mit flüssiger Luft eingefrorene Organ trockneten wir in einer LEYBOLD-Gefriertrockenanlage G 07, die für 1 - 1.5 kg Feuchtgut ausreicht, in 60 Stunden ohne Beheizung. Das 240 g (4.5 g) wiegende faserige und zähe Trockengewebe wurde unter Zusatz von 1.5 l (50 ml) Aceton 3 Minuten in einem Multimix bei 20000 U/Min. zerkleinert. Nach 2maliger weiterer Extraktion mit je 2.5 l (70 ml) Aceton war das Gewebe weitgehend entfettet, wog 225 g (4.05 g) und wurde 5 Stunden mit 1.5 l (80 ml) Äther im Soxhletapparat extrahiert. Die 4.5 g (0.12 g) Ätherextrakt unterwarfen wir einer Folch 1-Fraktionierung, indem wir sie in 36 ml (2.96 ml) Chloroform aufnahmen und mit 41 ml (3.3 ml) absolutem Äthanol fällten. In einigen Fällen reichte bereits 1 Teil Äthanol auf 1 Teil Chloroform zur Herstellung der Folch-Fällung aus.

Die 300 mg (10 mg) Folch 1-Fraktion verteilten wir mit dem System Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser/Pyridin/Petroläther(356:264:34.8:70.8:860) bei einem Phasenvolumen von 25 ml (5 ml) über 15 Schütteltrichterstufen. Die in den Unterphasen 15 befindlichen 20 mg DPI-K der Rinderlunge wurden über eine Zellolosesäule (12 cm x 1.2 cm) weitgehend von anorganischem Phosphat befreit. Die gereinigte Substanz betrug 5 mg. Aus der Kaninchenlunge erhielten wir durch die Verteilung ca. 1 mg DPI-K, der nicht weiter gereinigt wurde.

Der isolierte DPI-K lieferte beim papierchromatographischen Vergleich mit Rinderhirn-DPI-K die R_F -Werte 0.37 und 0.30 und

*) In Klammern die entsprechenden Werte für Kaninchenlunge.

stimmte in allen Reaktionen mit der Testsubstanz überein.

Das Inosit konnte als Bestandteil beider Komponenten des DPI-K der Rinderlunge nachgewiesen werden. Dazu trugen wir 15 Flecken mit je ca. 200 µg Substanz auf Formaldehydpapier auf, schnitten die Diphosphoinositide 1 und 2 aus den entwickelten und mit Nilblau angefärbten Chromatogrammen aus und extrahierten die Papierstückchen 2mal 8 Stunden mit je 30 ml Chloroform/Äthanol/Wasser (80:20:2.5) durch Koehen am Rückflußkühler. Die filtrierten Extrakte wurden nach Einengen zur Trockne mit je 0.6 ml 6 n Salzsäure 6 Stunden bei 100° hydrolysiert. In den wässrigen von Salzsäure und Ionen freien Hydrolysatanteilen wurde durch 2 dimensionale Chromatographie freies Inosit nachgewiesen (siehe Seite 87). Aus dem lipophilen Anteil dieser Hydrolysate konnten wir chromatographisch für jede der beiden Diphosphoinositidkomponenten die gleichen Fettsäuren nachweisen, die wir auch im Rinderhirn-DPI-K gefunden hatten:

Fettsäuren	Paraffin 10% Eisessig R_f
Stearinsäure	0.63
Palmitinsäure	0.74
Ölsäure	0.74
Linolsäure	0.83
Linolensäure	0.88

Eine Hydrolyse mit 5 n Salzsäure ergab nach 10 Min. einen Phosphorsäureester, der mit dem Fließmittel n-Propanol/Ammoniak/Wasser (5:4:1) einen R_f -Wert von 0.3 lieferte und mit Inositdiphosphat identisch sein dürfte.

D. Einbaustudien von ^{32}P in die Rattenorgane Gehirn, Herzmuskel, Lunge, Leber, Milz und Niere

I. Markierung der Phosphatide mit ^{32}P in vivo

Für diese Einbauversuche verwendeten wir erwachsene männliche Ratten gleichen Alters und Gewichtes, da BÜRGER¹⁸⁰⁾ fand, daß Alter und Geschlecht den Phosphatidgehalt beeinflussen.

Für die Einbauzeiten 4, 8 und 32 Stunden standen je 3 Ratten zur Verfügung:

4 Std.	8 Std.	32 Std.
Rattengewichte in g	Rattengewichte in g	Rattengewichte in g
175, 170 185	195, 180, 165	172, 190, 190

Die radioaktive Substanz bezogen wir trägerfrei als Na_2HPO_4 in steriler isotonischer Lösung von der Firma BAYER AG, Leverkusen, in Mengen von jeweils 5 m C/ml. Die spezifische Aktivität des Phosphors betrug zur gleichen Zeit 1 m C/ μg P. Das Volumen der Lösungen wurde auf 5 ml gebracht, so daß 1 ml davon 1 m C ^{32}P entsprach. Jedes der Tiere erhielt 330 μC ^{32}P /100 g Körpergewicht und damit jeweils 0.567 - 0.627 ml der verdünnten Lösungen subcutan verabreicht. Nach 4, 8 und 32 Stunden wurden die Tiere durch Einbringen eines chloroformgetränkten Wattebausches in eine Kammer narkotisiert, durch Öffnen der Halsschlagader getötet und die zu untersuchenden Organe sofort entnommen.

II. Extraktion der Phosphatide

Nach Einfrieren in flüssiger Luft erfolgte eine 12stündige Gefriertrocknung der Organe in der LEYBOLD - Apparatur. Die gefriergetrockneten Organe wurden mit ca. 2 Volumenanteilen gereinigtem Seesand unter Anfeuchten mit Aceton verrieben. Der Zusatz von Seesand erleichterte das Zerkleinern und schaffte

180) M.BÜRGER, Altern und Krankheit als Problem der Biomorphose, VEB Georg Thieme, Leipzig S. 174 (1960)

eine genügend große Oberfläche zur Extraktion. Die Verreibungen brachten wir in Extraktionshülsen ein und entfetteten durch 5maliges Übergießen mit gleichen Volumenteilen Aceton, Anschließend wurde mit 2 - 3 Volumenteilen Äther 24 Stunden im Soxhlet extrahiert. Die Ätherextrakte der Organe engten wir im Vakuum zur Trockne ein und lösten sie in so viel Chloroform/Äthanol/Wasser (80:20:2.5) (Unterphase), daß 0.1 ml dieser Lösung ca. 1.5 mg Phosphatid enthielten. Die genauen Extraktgehalte wurden bestimmt, indem wir den Lösungen aliquote Teile entnahmen, in Aluminiumschälchen über Phosphorperoxyd und Paraffin im Vakuum 12 Stunden trockneten und dann auswogen.

III. Papierchromatographische Auftrennung und Lokalisierung der Phosphatide durch Autoradiographie

Es wurden Extraktmengen zwischen 2.5 und 8 mg pro Strich auf Formaldehydpapier aufgetragen und absteigend über 37 cm in 16 Stunden entwickelt. Zur Auswertung der Diphosphoinositidflecken mußten 6 - 8 mg Extrakt aufgetragen werden, da andernfalls die Fehlermöglichkeit infolge zu niedriger Phosphorgehalte der Flecken beträchtlich zunimmt. Eine orientierende Anfärbung der Chromatogramme erfolgte durch 1stündiges Bedampfen mit Osmiumtetroxyd.

Dann legten wir die Chromatogramme in lichtdichten Behältern an Röntgenfilme PERUTZ PER-X (30 cm x 40 cm) an und beschwerten mit Glasplatten. Nach 5tägiger Expositionszeit wurden die Autoradiogramme mit AGFA-Röntgenentwickler 4 Minuten in völliger Dunkelheit entwickelt, abgewaschen, 30 Minuten fixiert und 1 Stunde gewässert.

Anhand der Autoradiogramme ließen sich sämtliche Phosphatide genau lokalisieren und in Form runder Scheiben von 2 cm Durchmesser aus den Chromatogrammen ausstanzen.

IV. Messung der relativen Aktivität und des Phosphorgehaltes

1. Strahlungsmessung im Methandurchflußzählrohr

Die runden 2 cm Durchmesser aufweisenden Chromatogrammflecken wurden in Aluminiumschälchen gleichen Durchmessers eingelegt und in den Meßraum des Methandurchflußzählers MS MD 632/1 gebracht. Dieser wurde nach dem Verschließen eine Minute mit Methan durchspült und die Probe 4 Minuten mit Hilfe des digitalen Strahlungsmeßplatzes MS Str.610/1 (TELEFUNKEN) gemessen. Diese Meßdauer ist erforderlich, um den mittleren statistischen Meßfehler gering zu halten. Dieser mittlere Fehler bei Aktivitätsmessungen kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$m_{\text{rel.}} = \pm \frac{100}{\sqrt{N}} \%$$

$m_{\text{rel.}}$ = mittlerer Meßfehler

N = arithmetisches Mittel
der Messungen

Eine Erhöhung des Wertes N, d.h. der gemessenen Impulse, bedeutet also eine Verringerung des statistischen Meßfehlers. Da in unserem Fall die geringsten Impulszahlen bei 600 Imp./4 Minuten lagen, war der Fehler in diesen seltenen Fällen 4%. Dadurch hatten wir eine ausreichende Genauigkeit.

2. Korrektur der erhaltenen Meßwerte

Nulleffekt ("background activity"): Zu Beginn jeder Meßreihe wurde bei 1/2 stündiger Meßzeit der Nulleffekt der Versuchsanordnung, (Aluminiumschälchen mit leerem Formaldehydpapier) festgestellt. Er betrug durchschnittlich 72 Imp./4 Minuten und wurde von den erhaltenen Meßwerten subtrahiert.

Zerfallsfaktor: Die erhaltenen Meßwerte rechneten wir mit Hilfe der jeweiligen Faktoren der theoretischen ^{32}P -Zerfallsreihe um (Tabelle 21).

T a b e l l e 21

³²P-Zerfallsreihe

Tag:	0	Faktor:	1.00	Tag:	16	Faktor:	2.21
	1		1.05		17		2.32
	2		1.10		18		2.43
	3		1.16		19		2.56
	4		1.21		20		2.68
	5		1.28		21		2.82
	6		1.34		22		3.03
	7		1.42		23		3.12
	8		1.49		24		3.27
	9		1.56		25		3.45
	10		1.64		26		3.62
	11		1.72		27		3.79
	12		1.81		28		4.00
	13		1.90		29		4.18
	14		2.00		30		4.41
	15		2.09				

Reziproker Wirkungsgrad:

Die zur Korrektur der Meßwerte ebenfalls erforderlichen reziproken Wirkungsgrade ($1/\eta$) wurden experimentell ermittelt. Dazu stellt man aus einer ³²P-Phosphatlösung bekannter spezifischer Aktivität eine Verdünnungsreihe her. Von diesen verdünnten Lösungen trägt man Mengen, die theoretisch zwischen 100 Imp./Min. ($4.5 \times 10^{-5} \mu C$) und 30000 Imp./Min. ($1.35 \times 10^{-1} \mu C$) liefern, gleichmäßig auf Formaldehydpapierscheibchen von 2 cm Durchmesser auf und zählt die Impulse aus. Dividiert man den theoretischen Wert der Imp./Min. durch die Zahl der tatsächlich gezählten Imp./Min., so erhält man den reziproken Wirkungsquotienten $1/\eta$ (Tabelle 22).

T a b e l l e 22

Reziproke Wirkungsgrade für ^{32}P im Methandurchflußzählrohr
auf Formaldehydpapier

Impulse	$1/\eta$	Impulse	$1/\eta$
100	2.95	2600	5.05
200	3.39	2800	5.10
300	3.65	3000	5.14
400	3.83	3200	5.18
500	3.98	3400	5.22
600	4.10	3600	5.26
700	4.20	3800	5.30
800	4.28	4000	5.33
900	4.36	4200	5.36
1000	4.43	4400	5.39
1100	4.49	4600	5.42
1200	4.55	4800	5.45
1300	4.60	5000	5.47
1400	4.65	5500	5.54
1500	4.69	6000	5.59
1600	4.73	6500	5.64
1700	4.77	7000	5.69
1800	4.81	8000	5.78
1900	4.84	9000	5.85
2000	4.88	10000	5.93
2200	4.94	15000	6.19
2400	5.00	20000	6.38
		30000	6.64

3. Phosphorbestimmung

Sie erfolgte nach dem auf Seite 100 beschriebenen Verfahren. Da das Gewicht der ausgestanzten Papierflecken nur 49.5 mg betrug, genügten zur Veraschung 0.4 ml Perchlorsäure und dementsprechend 2 ml Wasser und je 0.3 ml Ascorbinsäure- und Ammoniummolybdatlösung, vorausgesetzt, daß der Phosphorgehalt der Flecken zwischen 0.1 - 10 μg lag. Bei höheren Phosphorgehalten wurden die Ansätze entsprechend vervielfacht. Zur Messung der Extinktionen verdünnten wir die Ansätze mit Blindlösung, wenn die Werte wesentlich über 1 lagen. Die Papierblindwerte wogen ebenfalls 49.5 mg und die ermittelten Extinktionen 0.05 (für 4 und 32 Std.) und 0.04 (für 8 Std.) konnten unmittelbar von den Extinktionen der Phosphatidflecken subtrahiert werden.

V. Berechnung der spezifischen Aktivität

Das folgende Beispiel zeigt die Berechnung der relativen und der spezifischen Aktivität des Diphosphoinositids 1 (DPI 1) und des Diphosphoinositids 2 (DPI 2) von Rattenhirn nach 4stündiger Markierung. Die hierzu nötigen Korrekturfaktoren wurden den Tabellen 21 und 22 entnommen.

Ankunftsdatum der Na_2HPO_4 -Lösung: 1.3.62 = Tag 0 (Zerfallsfaktor = 1)

13.3.62 = Tag 12 (Zerfallsfaktor = 181)

Subst.	Imp./4 Min.	Imp./Min.	$1/\eta$	F	Rel.Akt.	$\mu\text{g P}$	Spez.Akt.
DPI 1	744	186	3.33	1.81	1121	1.305	905
DPI 2	1244	311	3.67	1.81	2066	1.9	1087

$$\text{Rel.Akt.} = \frac{\text{Imp./4 Min.} \cdot \frac{1}{\eta} \cdot F}{4} [\text{Imp./Min.}]$$

$$\text{Spez.Akt.} = \frac{\text{Rel.Akt.}}{P} \frac{[\text{Imp./Min.}]}{[\mu\text{g}]}$$

Imp./4 Min. = Abgelesener Wert - Nulleffekt

$1/\eta$ = Reziproker Wirkungsgrad

F = Zerfallsfaktor von ^{32}P

Rel.Akt. = Relative Aktivität

$\mu\text{g P}$ = Phosphorgehalt des Fleckens

Spez.Akt. = Spezifische Aktivität

VI. Meßdaten

Von den Gesamtextrakten wurden jeweils ca. 300 - 400 μg Substanz auf Formaldehydpapierscheibchen möglichst gleichmäßig aufgetragen und daraus ihre spezifische Aktivität bestimmt. Dabei sollte die Zahl der vom Meßgerät registrierten Impulse pro Minute wegen der Totzeit des Meßkopfes möglichst unter 20000 liegen. Da die Gehirnextrakte die weitaus niedrigsten relativen Aktivitäten aufweisen, wurden hiervon jeweils ca. 800 μg Substanz pro Messung verwendet.

T a b e l l e 23

Meßdaten für Gesamtextrakte

Organ	Imp./4 Min.	Imp./Min.	1/2	F	Rel.Akt.	µg P	Spez.Akt.
Gehirn	3860	965	4.41	1.81	7700	18.55	415
Niere	26088	6522	5.64	1.81	66580	8.83	7540
Lunge	39680	9920	5.92	1.81	106300	9.0	11810
Herzmuskel	11280	2820	5.1	1.81	26030	7.5	3470
Milz	19652	4913	5.46	1.81	48550	8.63	5620
Leber	59632	14908	6.18	1.81	166760	9.35	17840
Einbauzeit 4 Stunden							
Gehirn	5260	1315	4.6	1.72	10405	21.8	475
Niere	32576	8144	5.79	1.72	81105	9.77	8300
Lunge	44936	11234	5.99	1.72	115740	9.7	11930
Herzmuskel	15352	3838	5.3	1.72	34990	8.9	3930
Milz	20824	5206	5.5	1.72	49240	8.05	6120
Leber	60428	15107	6.19	1.72	160840	8.08	19910
Einbauzeit 8 Stunden							
Gehirn	6792	1698	4.77	1.90	15400	17.32	890
Niere	26740	6685	5.66	1.90	71890	8.15	8820
Lunge	42416	10604	5.96	1.90	120080	10.2	11760
Herzmuskel	12352	3088	5.16	1.90	30275	7.17	4220
Milz	18680	4670	5.43	1.90	48180	7.27	6630
Leber	47024	11756	6.02	1.90	134470	10.75	12510
Einbauzeit 32 Stunden							

Die folgende Tabelle 24 zeigt einen Auszug aus dem Arbeitsprotokoll zur Ermittlung der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Phosphatide. Die spezifischen Aktivitäten der Diphosphoinositide wurden jeweils in Doppelbestimmungen ermittelt und die daraus resultierenden Mittelwerte in Tabelle 13 eingesetzt.

T a b e l l e 24

Bestimmung der spezifischen Aktivitäten aufgetrennter Phosphatide
nach 4 Stunden Einbauzeit

Phosphatid	Imp./4 Min.	Imp./Min.	1/2	F	Rel.Akt.	µg P	Spez.Akt.
Untersuchtes Organ: Gehirn							
PC/PÄ	1378	345	3.74	1.81	2335	30.0	78
PS	-	-	-	-	-	6.0	0
MPI	1544	386	3.81	1.81	2655	3.05	872
DPI 1	800	200	3.39	1.81	1229	1.305	945
DPI 1	744	186	3.33	1.81	1121	1.24	905
DPI 2 (TPI)	1244	311	3.67	1.81	2066	1.9	1087
DPI 2 (TPI)	1224	306	3.66	1.81	2029	1.88	1079
ph	10389	2597	5.05	1.81	23600	6.89	3430
Untersuchtes Organ: Niere							
PC/PÄ	72135	18034	6.3	1.81	205600	28.25	7300
PS	2325	581	4.08	1.81	4290	4.61	930
MPI	40886	10222	5.94	1.81	110000	4.17	26400
DPI 1	2776	694	4.19	1.81	5266	0.748	7040
DPI 1	3168	792	4.27	1.81	6117	0.807	7580
ph	16494	4124	5.35	1.81	39900	1.245	32000
Untersuchtes Organ: Lunge							
PC/PÄ	68852	17213	6.27	1.9	204970	19.83	10250
PS	1892	473	3.95	1.81	3380	4.09	825
MPI	25497	6374	5.63	1.81	65000	2.87	22600
DPI 1	10888	2722	5.08	1.81	25028	0.84	29800
DPI 1	12880	3220	5.18	1.81	30190	0.915	33000
DPI 2 (TPI)	3272	818	4.29	1.81	6352	0.366	17350
DPI 2 (TPI)	2836	709	4.2	1.81	5390	0.338	15950
ph	23920	5980	5.59	1.90	63350	1.73	36600

Fortsetzung Tabelle 24

Phosphatid	Imp./4 Min.	Imp./Min.	1/2	F	Rel.Akt.	µg P	Spez.Akt.
Untersuchtes Organ: Herzmuskel							
PC/PÄ	21216	5304	5.51	1.81	52995	43.2	1120
PS	542	136	3.9	1.81	761	0.81	421
MPI	13018	3255	5.19	1.81	30550	3.76	8150
DPI 1	2968	742	4.24	1.81	5698	0.441	12920
DPI 1	3336	834	4.31	1.81	6485	0.475	13650
DPI 2 (TPI)	1692	423	3.87	1.81	2960	0.244	12130
DPI 2 (TPI)	1.688	422	3.86	1.81	2946	0.271	10870
ph	50930	12733	6.07	1.81	139500	2.54	55000
Untersuchtes Organ: Milz							
PC/PÄ	20878	5220	5.5	1.81	52080	17.2	3040
PS	1403	351	3.74	1.81	2375	4.81	494
MPI	16220	4055	5.34	1.81	39180	2.54	15400
DPI 1	4508	1127	4.51	1.81	9200	0.63	14600
DPI 1	4928	1232	4.57	1.81	10190	0.661	15420
ph	51037	12759	6.08	1.81	139900	3.76	37200
Untersuchtes Organ: Leber							
PC/PÄ	99260	24815	6.51	1.9	306200	13.76	22300
PS	3387	847	4.32	1.81	6610	3.73	1775
MPI	15251	3813	5.3	1.81	36550	9.4	3900
DPI 1	4668	1167	4.53	1.81	9568	1.035	9245
DPI 1	4844	1211	4.55	1.81	9975	1.055	9455
DPI 2 (TPI)	1460	365	3.77	1.81	2485	0.352	7060
DPI 2 (TPI)	1540	385	3.81	1.81	2650	0.37	7160
ph	73136	18284	6.3	1.81	208500	4.13	50500

Abkürzungen: PC/PÄ = Lecithin/Phosphatidyläthanolamin
 PS = Phosphatidylserin
 MPI = Monophosphoinositid
 DPI 1 = Diphosphoinositid 1
 DPI 2 = Diphosphoinositid 2 (Triphosphoinositid)
 (TPI)
 ph = anorganisches Phosphat

L e b e n s l a u f

Am 29. Oktober 1931 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Ernst Wiedemann und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Mitzel, in Kaufbeuren geboren.

Von 1938 - 1943 besuchte ich die Volksschule und ab 1943 die Oberrealschule in Kaufbeuren. Dort legte ich 1951 die Reifeprüfung ab.

Die zweijährige Tätigkeit als Apothekerpraktikant leistete ich in der Sonnen-Apotheke in Kaufbeuren ab. Im September 1953 bestand ich die staatliche Vorprüfung in Augsburg. Anschließend begann ich im Winter-Semester 1953/54 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Pharmaziestudium, das ich im Juli 1957 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen beendete.

Vom Juli 1957 bis Juli 1958 war ich in der Hall'schen Apotheke in München tätig und erhielt im August 1958 die Bestallung als Apotheker.

Die vorliegende Arbeit begann ich im September 1958 am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München. Sie wurde im Juni 1962 abgeschlossen.

